

Avaliação *in Vitro* do Potencial Antimicrobiano de Extratos do Urucum (*Bixa orellana* L.)

In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Potential of Urucum Extracts (*Bixa orellana* L.)

João Portilho Pereira da Silva Junior^{*a}; Janaína da Costa Nogueira Nobre^a; Waldireny Rocha Gomes^b; Adriana Dantas Gonzaga de Freitas^c

^a Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Biológicas, Curso de Ciências Biológicas. AM, Brasil.

^b Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. AM, Brasil.

^c Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Morfologia. AM, Brasil.

*E-mail: jppsportilho@gmail.com

Resumo

A espécie *Bixa orellana* L., popularmente conhecida como urucum, é utilizada como corante. Embora estudos descrevam propriedades medicinais da *Bixa orellana* L., ainda há poucos relatos sobre suas propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas, abrindo assim maiores possibilidades de estudos envolvendo essa planta. A investigação da atividade antimicrobiana, em espécies vegetais, se apresenta como uma alternativa a um problema emergente de saúde pública, a resistência microbiana, que vem aumentando, de forma alarmante, por conta do uso indiscriminado de antibióticos pela população. Esta pesquisa teve como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano dos extratos de folhas, cascas e sementes do urucum, a partir de processos de extração de compostos ativos por ultrassom e soxhlet. Os extratos obtidos foram analisados frente a quatro micro-organismos patogênicos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. A avaliação da atividade antimicrobiana ocorreu através do método de difusão em disco em meio Miller Hinton, os discos contendo os extratos vegetais foram depositados sobre as culturas bacterianas previamente inoculadas, o teste foi realizado em triplicata. O principal resultado observado foi o halo de inibição com extratos de folhas para *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, enquanto para os testes com extratos da casca apresentou halo inibitório contra *Staphylococcus aureus*. Novos testes devem ser realizados para comprovar a atividade antimicrobiana desta espécie.

Palavras-chave: *Bixa orellana* L. Urucum. Potencial Antimicrobiano. Extratos.

Abstract

The species *Bixa orellana* L. popularly known as annatto, is used as a natural coloring and food coloring. Although studies describe medicinal properties of *Bixa orellana*, there are still few reports on its anti-inflammatory and antimicrobial properties, thus opening up greater possibilities for studies involving this plant. The investigation of antimicrobial activity in plant species with medicinal potential is an alternative to an emerging public health problem, microbial resistance, which has been increasing alarmingly due to the indiscriminate use of antibiotics by the population. Research in the area of microbiology is necessary in the search for new active compounds, especially those from natural sources that can act to combat these new strains. This research aimed to evaluate the antimicrobial potential of extracts of annatto leaves, bark and seeds based on active compound extraction processes using ultrasound and soxhlet. The extracts obtained were analyzed against four pathogenic microorganisms *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. The evaluation of antimicrobial activity was carried out using the disk diffusion method in Miller Hinton medium, the disks containing the plant extracts were deposited on the previously inoculated bacterial cultures, the test was carried out in triplicate. The main results observed were the inhibition halo with leaf extracts for *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*, while tests with bark extracts showed an inhibitory halo against *Staphylococcus aureus*. New tests must be developed to prove the antimicrobial activity of this species.

Keywords: *Bixa orellana* L. Annatto. Antimicrobial Potential. Extracts.

1 Introdução

A espécie vegetal *Bixa orellana* L. e o seu fruto urucum, popularmente conhecido pelo seu uso como condimento e como corante natural, apresenta inúmeras aplicações dentro da medicina tradicional, em função de suas propriedades farmacológicas, como cicatrizante, analgésicas, hemostáticas e antioxidantes, além disso, estudos já descreveram a espécie como fonte de agentes antimicrobianos, indicando que as sementes são a parte mais utilizada na medicina popular para o tratamento de doenças cardíacas, queimaduras, infecções respiratórias, infecções de pele, gonorreia, diarreia e asma (SANTOS, 2022).

As ações antimicrobiana e antioxidante de *Bixa orellana* L. foram analisadas no estudo de Lima Viana *et al.* (2018), em que se notou que os extratos metanólicos de sementes e folhas dessa espécie tinham ação contra bactérias Gram-positivas como *S. mutans* e *S. sanguinis*. Extratos etanólicos das sementes apresentaram resultados inibitórios contra *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *E. coli* (Karmakar *et al.*, 2018). Esses resultados contribuem com a busca por compostos com ação antimicrobiana, que procuram trazer soluções alternativas a um problema de saúde pública, a resistência de alguns micro-organismos patogênicos, fato esse causado pelo uso inadequado de antibióticos (ROZZATO, 2012).

Com o aumento de casos que tratam de micro-organismos resistentes aos antibióticos disponíveis no mercado, é necessário investigação por alternativas para o enfrentamento desta situação. O aparecimento de bactérias resistentes aos medicamentos pode ser considerada uma manifestação natural regida pelo fator evolutivo que a adaptabilidade genética desses organismos proporciona (Oliveira *et al.*, 2014).

Os antibióticos são uma classe de fármacos indispensáveis e extremamente necessários para a medicina como se conhece, sem esses haveria perdas na expectativa de vida que se conquistou ao longo de décadas. No entanto, a potência dos antibióticos está ameaçada, há uma explosão de casos, não só de resistência a um fármaco, mas a muitos desses. Um exemplo é o *S. aureus* resistente à penicilina e que causa mais de 100 mil infecções a cada ano e começou a se espalhar em infecções adquiridas na comunidade, deixando de ser hospitalar. Além disso, observa-se uma diminuição na suscetibilidade dos antibióticos com o tempo e não há novas classes de antibióticos, sendo desenvolvidas para ajudar no combate às bactérias. O aumento da resistência bacteriana tem levado a um aumento na necessidade de novos fármacos e novas classes de antibióticos, tanto para infecções adquiridas em hospitais quanto na comunidade (BRITO *et al.*, 2012).

No Brasil, observou-se, na última década, um crescimento no emprego de práticas terapêuticas alternativas, tendo como base políticas voltadas ao Sistema Único de Saúde (SUS), especialmente, a utilização de plantas medicinais e fitoterápicos (ZENI *et al.*, 2017).

Apesar da grande diversidade de antimicrobianos, que agem sobre diversos micro-organismos patogênicos, estudos buscam por um antimicrobiano ideal, ou seja, aquele que apresenta maior espectro de ação, menor toxicidade, menor custo e menor índice de resistência bacteriana, haja vista que já existe resistência bacteriana a alguns produtos antimicrobianos (NASCIMENTO *et al.*, 2000; PAZHANI, 2004).

Em função de literatura preexistente comprovando atividade positiva antimicrobiana de extratos variados de Urucum, o crescente problema com micro-organismos resistentes aos fármacos existentes no mercado e a pouca exploração científica e comprovada de plantas de uso popular e nativas da Amazônia, considera-se válido o estudo dos extratos de urucum, para possivelmente ampliar e comprovar a validade do mesmo de forma prática e comercial.

Tendo em vista estes fatores, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana nos extratos orgânicos de *Bixa orellana* L. contra micro-organismos teste e comparar os resultados obtidos dos três processos de extração diferentes.

2 Desenvolvimento

2.1 Metodologia

2.1.1 Coleta e preparação do material vegetal

A coleta das amostras do urucum (*Bixa orellana* L.) foi realizada em duas localidades: no campus da Universidade Federal do Amazonas e na fazenda experimental da UFAM, as amostras coletadas foram transportadas para o Laboratório de Pesquisa em Microbiologia, no prédio 01 do ICB (Instituto de Ciências Biológicas). Após a coleta e transporte, parte do material foi higienizado, pesado, identificado, seccionado e levado à estufa de circulação de ar, no qual foi mantida a temperatura constante de 55 °C, pelo período de quatro a cinco dias, após o período de secagem, as amostras foram maceradas com o auxílio do almofariz e pistilo.

2.1.2 Obtenção dos extratos

Para a obtenção dos extratos foram utilizados três métodos: soxhlet, ultrassom e maceração estático, além do uso do rotaevaporador, utilizado para a evaporação dos solventes empregados na extração. Para os métodos realizados houve a definição de medida de 50 g de folhas, fruto (casca e semente) do urucum (*Bixa orellana* L.) com 500 mL dos solventes hexano e metanol. Os extratos foram preparados no Laboratório de Biorgânica da Universidade Estadual do Amazonas (ESA-UEA).

2.1.3 Micro-organismos teste

Foram utilizadas quatro cepas bacterianas de padrões internacionais (ATCC– American Type Culture Collection), sendo essas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13899).

2.1.4 Avaliação da atividade antimicrobiana da *Bixa orellana* L.

Para a avaliação de sensibilidade dos micro-organismos aos extratos, inicialmente, as cepas bacterianas foram reativadas em caldo Muller-Hinton (MH) e incubadas a 37 °C por 24h. Em seguida, foram estriadas em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Muller-Hinton, de modo a formar uma camada uniforme sob toda a superfície do meio de cultura. Cada bactéria passou por esse processo em triplicata. Posteriormente, foram depositados sob o meio de cultura três discos de papel filtro embebidos nos extratos obtidos, mantendo-se uma distância razoável entre os discos para evitar interferências nos possíveis halos, os extratos foram avaliados nas seguintes concentrações (mg/mL): C1 (0,100), C2 (0,150), e C3 (0,200). Os controles utilizados foram o Dimetilsulfóxido (DMSO) e o antibiótico (tetraciclina), um negativo e o outro positivo, respectivamente.

As placas foram incubadas a 35 °C em câmeras climatizadas do tipo B.O.D (Biological Oxygen Demand) por

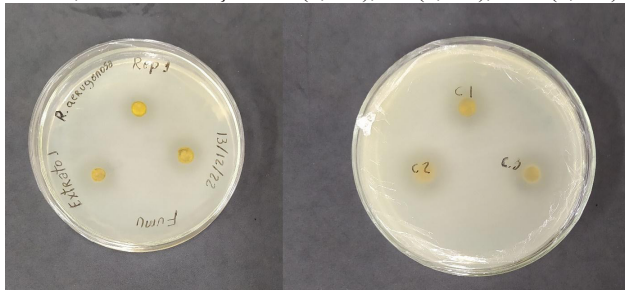
72h, durante esse período foi observado o desenvolvimento dos micro-organismos e o possível surgimento de halos de inibição, que foram medidos através de um paquímetro digital, os valores foram somados e uma média foi retirada entre esses dados obtidos.

2.2 Resultados e discussão

Após os três dias de observação dos testes com dois extratos analisados, o extrato metanólico da folha no método de ultrassom apresentou atividade antimicrobiana frente à bactéria *Pseudomonas aeruginosa* formando halos de inibição em todas as três concentrações utilizadas, 0,10; 0,15 e 0,20 respectivamente (Figura 1), já para as bactérias *Staphylococcus aureus* nas concentrações de 0,10 e 0,15; *Klebsiella pneumoniae* nas concentrações de 0,15 e 0,20 e *Escherichia coli* nas concentrações de 0,10 e 0,20 houve formação de halos que, apesar de tamanho considerável, estavam fracos e com crescimento bacteriano ainda presentes.

No extrato de folha com hexano pelo método de soxhlet, houve resposta contra as bactérias *K. pneumoniae* e *Escherichia coli*, formando halos, principalmente, nos discos de maior concentração, porém fracos e sem atividade inibitória aparente. Contra as bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* não houve atividade antimicrobiana.

Figura 1 - Halos de inibição no último dia de teste com *Pseudomonas aeruginosa* com extratos da folha com o solvente hexano, nas concentrações C1 (0,100), C2 (0,150), e C3 (0,200)



Fonte: os autores.

Testes realizados por Dantas *et al.* (2018) selecionaram espécies vegetais e promoveram um estudo etnofarmacológico, destacando seu potencial antibacteriano frente às cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Concluiu-se que os extratos etanólicos e glicólicos apresentaram maior inibição de *Staphylococcus aureus*.

Para o solvente metanol, pelo método de ultrassom, houve halo de inibição para a bactéria *P. aeruginosa*, em que a média mínima de halo foi de 14 mm e a maior média foi de 18 mm no segundo dia de teste, sendo a terceira repetição a placa com a média estável. Para as outras bactérias, apesar de haver formação de halos constantes, como na C2 (concentração de 0,150 mg/mL) da *S. aureus*, não foi observada nenhuma atividade inibitória, em função do crescimento bacteriano dentro do halo, apresentando atividade bacteriostática. Para a *E. coli*, a formação dos halos foi pequena e inconstante, também ocorreu presença de pigmento, mas sem atividade

inibitória. Com a *K. pneumoniae*, a resposta foi um pouco mais tardia se comparada com as outras bactérias, houve formação de halos cujo tamanho médio aumentou à medida que a concentração aumentava.

Estudo realizado por Sousa *et al.* (2019) mostrou que o extrato de *Bixa orellana* não demonstrou eficácia frente à cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, o que foi evidenciado pela ausência de halo no estudo das autoras.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as espécies bacterianas que mais causam infecções hospitalares incluem: *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. Todas apresentam fácil poder de disseminação e grande potencial infeccioso, podendo causar diversos problemas à saúde, com diferentes graus de complexidade, sendo muitas vezes oportunistas e capazes de sofrer mutações a ponto de se tornarem multirresistentes, esgotando, assim, as intervenções medicamentosas e, muitas vezes, levando o paciente a um quadro mais grave (OMS, 2023).

Para o uso do solvente hexano, não foi observada atividade antimicrobiana contra as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

Analisando somente o uso dos solventes, o metanol conseguiu resultados mais aparentes que o hexano, essa diferença pode ter relação com a presença de componentes polares, já que o hexano é um solvente apolar. Resultados semelhantes foram observados em outros trabalhos com este perfil (SOBRAL *et al.*, 2016). Também foi observado certa pré-disposição ao surgimento de pigmentação.

Foram realizados testes com os extratos obtidos da casca do urucum, sendo esses dois extratos por soxhlet utilizando solvente hexano e metanol e um extrato obtido pelo banho ultrassônico com solvente hexano. Apesar de haver atividade antimicrobiana frente a *P. aeruginosa* e *S. aureus*, os resultados foram inconsistentes.

Para a inibição bacteriana, os melhores resultados foram obtidos com o extrato da folha usando metanol pelo método ultrassom, foram frente a *S. aureus* com a concentração de 0,150 g, no segundo dia de visualização. Com a utilização do mesmo solvente, mas com o método soxhlet, foi obtido halo maior perante a bactéria *S. aureus* no primeiro dia de observação.

Contrucci *et al.* (2019) buscaram determinar o efeito de óleos essenciais sobre as bactérias Gram-negativas *E. coli* e *P. aeruginosa* utilizando os métodos de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos óleos essenciais de oito espécies vegetais. De acordo com os resultados, todos os óleos demonstraram atividade antibacteriana, com destaque para os óleos de *Eucalyptus globulus* e *Rosmarinus officinalis* que foram mais ativos frente a *E. coli* (CBM=3,13 %), e menos eficazes contra a *P. aeruginosa* (CBM=25,00 %). Já o óleo de *Cymbopogon nardus* foi eficaz contra a *P. aeruginosa* na concentração de 6,25%.

Com o uso do solvente hexano, houve a formação dos

halos de inibição somente contra a bactéria *K. pneumoniae*. Dados semelhantes foram encontrados por Galindo-Cuspinera e Rankin (2005); e Galindo-Cuspinera *et al.* (2003), que estudando a *Bixa orellana* confirmaram que estas possuem um efeito inibitório do crescimento de micro-organismos, tais como: a *Neisseria gonorrhoea*, o *Bacillus subtilis*, o *Streptococcus faecalis* e *S. aureus*.

Costa *et al.* (2009) utilizaram o método de microdiluição e observaram atividade antifúngica do extrato de *Syzygium cumini* L. sobre cepas clínicas de *Candida albicans*.

As divergências encontradas neste trabalho e os demais podem ser ocasionadas pelas diversas formas de preparo dos extratos e das concentrações utilizadas, além das diferenças na composição química do vegetal, que podem ser influenciadas por diferentes fatores como: ambiente, temperatura, condições de cultivo e época de colheita.

3 Conclusão

Com a utilização das folhas de urucum, a formação de maiores halos de inibição bacteriana foi observada perante a bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*. O teste para a bactéria *Klebsiella pneumoniae* apresenta halo inibitório, mas com ação bacteriostática e não bactericida.

Referências

AZEVEDO, S.K.S.D.; SILVA, I.M. Plantas medicinais e de uso religioso comercializadas em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. *Acta Botânica Bras.*, v.20, n.1, p.185-194, 2006. doi: <https://doi.org/10.1590/S0102-33062006000100017>.

CONTRUCCI, B.A. *et al.* Efeito de óleos essenciais sobre bactérias gram-negativas isoladas de alimentos. *Ensaio e Ciência*, v.23 n.3, p.180-184, 2019. doi: [10.17921/1415-6938.2019v23n3p180-184](https://doi.org/10.17921/1415-6938.2019v23n3p180-184).

BRITO, M.A.D.; CORDEIRO, B.C. Necessidade de novos antibióticos. *J. Bras. Patologia Med. Lab.*, v.48, n.4, p.247-249, 2012. doi: <https://doi.org/10.1590/S1676-24442012000400002>.

COSTA, L.M.C. *et al.* Avaliação de água-de coco obtida por diferentes métodos de conservação. *Ciênc. Agrotec.*, v.29, n.6, p.1239-1247, 2005. doi: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542005000600019>.

DANTAS, T.L. *et al.* Estudo etnofarmacológico de plantas medicinais: atividade antimicrobiana de extratos de *Allium sativum* L. (alho) e *bixa orellana* l. (urucum). *J. Biol. Pharm. Agric. Manag.*, v.14 n.1, p.36-42, 2018. doi: <https://revista.uepb.edu.br/BIOFARM/article/view/2110>.

GALINDO-CUSPINERA, V.; WESTHOFF, D. C.; RANKIN, S.A. Antimicrobial properties of commercial annatto extracts against selected pathogenic, lactic acid, and spoilage microorganisms. *J. Food Prot.*, v.66, n.6, p.1074-1078, 2003. doi: [10.4315/0362-028x-66.6.1074](https://doi.org/10.4315/0362-028x-66.6.1074).

GALINDO-CUSPINERA, V.; RANKIN, S.A. Bioautography and chemical characterization of antimicrobial compound (s) in commercial water-soluble annatto extracts. *J. Agric. Food Chem.*, v.53, n.7 p.2524-2529, 2005. doi: [10.1021/jf048056q](https://doi.org/10.1021/jf048056q).

IROBI, O.; MOO-YOUNG, M.; ANDERSON, W. Antimicrobial activity of Annatto (*Bixa orellana*) extract. *Int. J. Pharm.*, v.34, n.2, p.87-90, 1996. doi: <https://doi.org/10.1076/phbi.34.2.87.13201>.

KARMAKAR, U.K. *et al.* Antioxidant, Analgesic, Antimicrobial, and Anthelmintic Activity of the Dried Seeds of *Bixa orellana* (L). *Int. J. Pharm.*, v.8, 2018.

MARTINS, S.G. *et al.* Estudo químico e antimicrobiano dos extratos de sementes e folhas do cumaru, *Dipteryx odorata* (fabaceae). *Ens. Ciênc.*, v. 25, p.34-38, 2021. doi: <https://doi.org/10.17921/1415-6938.2021v25n1p34-38>

NASCIMENTO, G.G.F. *et al.* Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz. J. Microbiol.*, 2000. doi: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822000000400003>

OLIVEIRA, A.L.D. *et al.* Mecanismos de resistência bacteriana a antibióticos na infecção urinária. *Rev. UNINGÁ*, v.20, 2014.

OMS, Organização Mundial da Saúde. Evolução das políticas brasileiras de saúde humana para prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos. Revisão de escopo. Geneva: OMS; 2023.

PAZHANI, G.P. *et al.* clonal multidrug-resistant *Shigella dysenteriae* type 1 strains associated with epidemic and sporadic dysenteries in eastern India. *Antimic. Agents Chemoth.*, v.48, n.2, p.681-684, 2004. doi: [10.1128/AAC.48.2.681-684.2004](https://doi.org/10.1128/AAC.48.2.681-684.2004)

ROZATTO, M.R. Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2012.

SANTOS, D.C. *et al.* *Bixa orellana* L. (Achiote, Annatto) as an antimicrobial agent: A scoping review of its efficiency and technological prospecting. *J. Ethnopharm.*, v.287, 2022. doi: [10.1016/j.jep.2021.114961](https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114961)

SANTOS, J.V.A.; COMARELLA, L. O uso indiscriminado de antibióticos e as resistências bacterianas. *Cad. Uninter*, v.10, n.18, 2021. doi: [10.1016/j.jep.2021.114961](https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114961).

SANTOS, N.Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. Texto Contexto - Enferm. v.13, p.64-70, 2004. doi: [10.1590/S0104-07072004000500007](https://doi.org/10.1590/S0104-07072004000500007).

SILVA, L.A. *et al.* O farmacêutico clínico e os custos com antimicrobianos: um estudo em uma unidade de terapia intensiva. *Saúde Coletiva*, v.11, 2021.

SOBRAL, M.A.F. *et al.* Atividade antibacteriana e moduladora in vitro de extrato metanólico e hexânico de *Beta vulgaris* spp. (Linnaeus). *Rev. Cubana Plantas Med.*, v.21, n.1, 2016.

SOUSA, M.L.R.; NOGUEIRA, J.C.; FREITAS, A.D.G. Culture media evaluation on the leucoagaricus gongylophorus and escovopsis sp. fungi development. *Rev. Agricul. Neotrop.*, v.8, p.b1-b7, 2021. doi: <https://doi.org/10.32404/rean.v8i3.5869>

SOUSA, M.L.R. *et al.* Micro-organismos associados a formigas cortadeiras: perfil morfológico e interações in vitro. *Sci. Amaz.*, v.9, n.2, p.b1-b13, 2020.

VIENA, J.L. *et al.* Hydroalcoholic extract and ethyl acetate fraction of *Bixa orellana* leaves decrease the inflammatory response to *Mycobacterium abscessus* Subsp. *Massiliense*. Evidence-Based Complem. Alternative Med., 2018. doi: [10.1155/2018/6091934](https://doi.org/10.1155/2018/6091934).

ZENI, A.L.B. Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil. *Ciênc. Saúde Coletiva*, v.22, p.2703-2712, 2017. doi: <https://doi.org/10.1590/1413-81232017228.18892015>.