



Extrato de *Matricaria chamomilla*: Atividade antimicrobiana e antioxidante em biofilmes de nanocelulose bacteriana

Matricaria chamomilla extract: Antimicrobial and antioxidant activity in bacterial nanocellulose biofilms

Vinícius Arno Centenaro Heimann¹, João Pedro Maximino Gongora Godoi², Gracielle Johann³, Samara Silva de Souza⁴, Paula Fernandes Montanher⁵

RESUMO

Algumas plantas, como a *Matricaria chamomilla*, são consumidas a milênios na forma de infusões ou extratos hidroalcoólicos, por possuírem substâncias com propriedades medicinais. O uso de etanol como extrator, pode propiciar uma melhor extração de substâncias com propriedades antibacterianas, pois muitas delas são polares ou saturadas de moléculas orgânicas. Essas substâncias podem ser resuspendidas em água e carregadas em suportes, como biofilmes de nanocelulose bacteriana (NCB), que apresentam alta capacidade de adsorção de água e compostos. Portanto, o objetivo do presente trabalho é avaliar a atividade antioxidante e antibacteriana do extrato etanólico de camomila e incorporá-lo em biofilmes de NCB. Para isso, em ensaios de adsorção do extrato, utilizou-se biofilmes de NCB como material adsorvente, e verificou-se por método DPPH, que cerca de 23% do conteúdo de antioxidantes do extrato foi adsorvido/absorvido após 24 horas. A atividade antibacteriana do extrato foi verificada frente a *S. aureus*, da qual não apresentou eficiência. Portanto, o extrato etanólico de camomila apresenta potencial antioxidante, além de poder ser carregado por biofilmes de NCB, porém mais estudos podem ser conduzidos acerca da atividade antimicrobiana frente a diferentes espécies de microrganismos.

PALAVRAS-CHAVE: Celulose bacteriana; *Escherichia coli*; Extrato vegetal; Extrato etanólico.

ABSTRACT

Some plants, such as *Matricaria chamomilla*, have been consumed for millennia in the form of infusions or hydroalcoholic extracts due to their medicinal properties. The use of ethanol as an extractor can provide a better extraction of substances with antibacterial properties, as many of them are polar or saturated with organic molecules. These substances can be resuspended in water and carried on supports, such as biofilms of bacterial nanocellulose (NCB), which have a high capacity for water and compound adsorption. Therefore, the objective of this study is to evaluate the antioxidant and antibacterial activity of chamomile ethanolic extract and incorporate it into NCB biofilms. For this purpose, in extract adsorption assays, NCB biofilms were used as adsorbent material, and it was found by the DPPH method that about 23% of the antioxidant content of the extract was adsorbed/absorbed after 24 hours. The antibacterial activity of the extract was tested against *S. aureus*, for which it did not show efficiency. Therefore, chamomile ethanolic extract shows antioxidant potential and can be loaded onto NCB biofilms; however, further studies can be conducted regarding the antimicrobial activity against different species of microorganisms.

KEYWORDS: Bacterial Cellulose; *Escherichia coli*; Plant extract; Ethanol extract.

¹ Bolsista do(a) Fundação Araucária. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. E-mail: vheimann@alunos.utfpr.edu.br ID Lattes: 9803218450972958.

² Bolsista do(a) Laboratório Multiusuário de Análises Biológicas e Biologia Molecular (BioMol). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. E-mail: jgodoi@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 2673457512873969.

³ Docente do Curso de Engenharia De Bioprocessos E Biotecnologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. E-mail: graciellej@utfpr.edu.br. ID Lattes: 0042481312764501.

⁴ Docente do Curso de Engenharia De Bioprocessos E Biotecnologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. E-mail: samarasouza@utfpr.edu.br. ID Lattes: 6497095708045068.

⁵ Docente do Curso de Engenharia De Bioprocessos E Biotecnologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. E-mail: paulamontanher@utfpr.edu.br. ID Lattes: 7565400427188557.



INTRODUÇÃO

Relatos da utilização de plantas como forma de tratamento de injúrias ou doenças podem ser encontrados em dados literários de milênios atrás, como o ruibarbo e o cinamomo, que são citados no "*Pen Ts'ao Kong Um*" juntamente com outras centenas de medicamentos utilizados pela farmácia chinesa em meados de 2.000-2.500 a.C. O uso das substâncias puras extraídas de plantas para aplicações terapêuticas, como a ementina, estricnina, salicina, atropina, digitoxina e outras, só foi desenvolvida com maior força no século XIX, estabelecendo a fitoquímica. Já no século XX, novos fármacos começaram a ser obtidos a partir de substâncias sintéticas, concentrando as pesquisas nessa área, porém, esse desenvolvimento mostrou-se bastante custoso, retornando certo interesse para os medicamentos originados de plantas (DAVIENNE; RADDI; POZETTI, 2004; LIMA, 2013).

As propriedades medicinais apresentadas por algumas plantas devem-se a substâncias produzidas em seu metabolismo que apresentam princípios ativos, podendo estar presentes em diferentes partes da planta, como nas sementes, raízes, flores, frutos e nas folhas. A *Matricaria chamomilla* (camomila) é uma das plantas mais utilizadas popularmente no Brasil para fins terapêuticos, principalmente os seus capítulos florais, por apresentarem propriedades calmantes, contra insônia, antioxidantes, antifúngicas, cicatrizantes, antiespasmódica, aromatizante e outras. Infusões preparadas ao ferver essas plantas em água, podem carregar algumas das substâncias produzidas em seu metabolismo, como os flavonoides, catequinas, polifenóis, alcaloides, vitaminas e sais minerais. Além das infusões, a depender da composição química da planta, outros solventes como o etanol podem ser utilizados para extrair os seus princípios ativos, através da transferência de massa da matriz vegetal para o solvente, obtendo um extrato líquido do qual se pode evaporar o solvente e concentrar os princípios ativos. Dessa forma, os extratos vegetais podem apresentar as suas propriedades medicinais, como a atividade antioxidante, antifúngica, antiespasmódica, anti-inflamatória, antialérgica, antitumoral, analgésica, fotoprotetora, antimicrobiana e outras (MARQUES, 2005; BRAIBANTE *et al.*, 2014; CARVALHO, 2019; ROCHA *et al.*, 2021).

Na obtenção do extrato vegetal, condições como o solvente utilizado, a temperatura do processo e a ação mecânica empregada são importantes, já que podem influenciar no rendimento da extração dos princípios ativos das plantas. Solventes específicos podem propiciar uma melhor extração de determinados compostos, como o etanol, que é ideal para extração de princípios ativos polares, que geralmente estão ligados a defesa da planta e ação antibacteriana. Altas temperaturas, apesar de parecerem atrativas para um processo de extração, podem degradar compostos termo sensíveis e causar a perda de alguma propriedade medicinal. Além disso, o preparo da matriz também é importante, sendo a moagem um dos principais pré-tratamentos a serem realizados, já que aumenta a superfície de contato entre o solvente e a matriz, permitindo que a extração seja mais efetiva. A umidade da matriz também pode ser um problema, já que pode haver competição entre a água e o solvente pela dissolução do soluto, sendo necessário realizar a secagem adequada da matriz. (VEGGI, 2009; BAYOUB *et al.*, 2010).

Algumas espécies de bactérias apresentam capacidade de sintetizar biofilmes de nanocelulose bacteriana (NCB), os quais apresentam uma vasta gama de propriedades, como: Biodegradabilidade, biocompatibilidade, alta porosidade, fácil esterilização e alta



resistência mecânica. Além disso, esses biofilmes podem passar por processos de modificação e funcionalização, incorporando novos compostos em suas estruturas e resultando em compósitos com novas propriedades, como atividade antioxidante ou antibacteriana. Compostos presentes em extratos provenientes de plantas e vegetais também podem ser incorporados em NCB, *in situ*, ou *ex situ*, como na combinação de NCB com extrato de casca de romã através da imersão, que conferiu propriedades positivas ao biocompósito para o tratamento da acne (FISCHER *et al.*, 2018; PHIMNUAN *et al.*, 2018; FERNANDES *et al.*, 2021).

O objetivo do presente trabalho é obter o extrato etanólico de camomila e incorporá-lo em biofilmes de NCB, bem como, avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante do extrato.

MATERIAIS E MÉTODOS

A camomila foi adquirida na forma seca, em um comércio de produtos naturais no mês de julho, na cidade de Dois Vizinhos, Paraná. O material foi triturado e padronizado em peneira ASTM 20. A umidade do material vegetal foi verificada comparando a massa inicial e final de uma amostra, em triplicata, submetida a 24 horas sob 105 °C em estufa de circulação e posteriormente o mesmo tempo em dessecador para atingir temperatura ambiente.

Para obtenção do extrato vegetal líquido, adotou-se metodologia adaptada descrita por Bayoub *et al.* (2010), na qual 80 g de camomila seca peneirada foram imersas em 400 mL de etanol 96%, durante um período de 72 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, a mistura foi filtrada em papel filtro e concentrada em evaporador rotativo durante 8 horas a 40 °C (BAYOUB *et al.*, 2010).

O extrato concentrado foi seco em liofilizador durante 72 horas e posteriormente, foi suspenso na proporção de 1 g de extrato para 100 mL de água ultrapura, em sonicador ultrassônico durante 7 min, sem pulsar e a 425 W de potência. Posteriormente, o volume do extrato de camomila suspenso foi corrigido para 500 mL em balão volumétrico, ajustando a proporção de 1:100 (m/v) para 1:250 (m/v). O extrato foi filtrado a vácuo em papel filtro e posteriormente, sob condições de esterilidade, em membrana Millipore de 0,22 µm.

Utilizou-se meio de cultura Hestrin-Schramm (HS) líquido para produção dos biofilmes de NCB e inóculos de *Komagataeibacter xylinus*. Os biofilmes de NCB foram preparados de modo estático, em estufa incubadora B.O.D a 28 °C durante sete dias, em placas de 96 poços, com 10% (v/v) de pré-inóculo bacteriano em meio HS. Posteriormente, os biofilmes foram purificados com NaOH 0,1 M, durante 24 horas a 50 °C em estufa de circulação de ar, após esse tempo, foram realizadas sucessivas lavagens com água destilada até atingir pH neutro. Por fim, os biofilmes foram esterilizados em água destilada utilizando autoclave a 121 °C por 20 min (HESTRIN; SCHRAMM, 1954).

Para incorporação do extrato vegetal, foram realizados dois ensaios em triplicata, com duas concentrações diluídas do extrato, 1:1 (v/v) e 1:2 (v/v). Para cada replicata foram adicionados 20 biofilmes com diâmetro médio de 6 mm e espessura média de 1,5 mm, submersos em 20 mL dos extratos diluídos. A incorporação foi conduzida por 144 horas sob condições estáticas a temperatura ambiente, da qual foram coletadas amostras em 0, 24 e 144 horas.

Para a análise da incorporação, realizou-se concomitantemente à atividade antioxidante por método de captura de radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), na

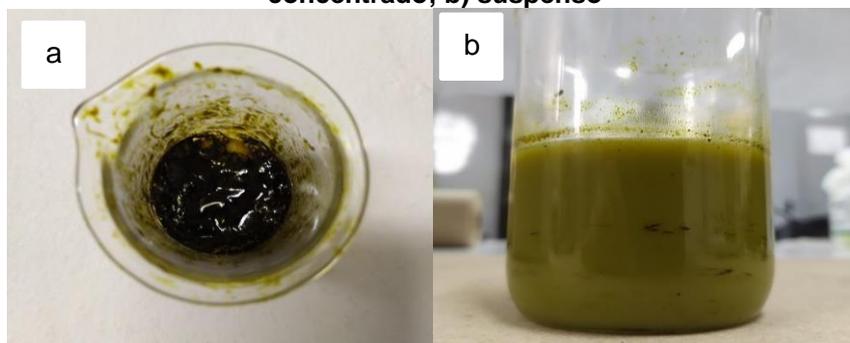
qual adicionou-se 240 μL de DPPH em uma absorbância inicial de 1,023 em 10 μL das amostras coletadas em diferentes tempos e, posteriormente, verificou-se a absorbância a 515 nm em espectrofotômetro de placas.

O teste de suscetibilidade a antimicrobianos foi conduzido de acordo com o método de disco-difusão descrito pela *Clinical and Laboratory Standards Institute M2-A8* (CLSI, 2003). A cepa utilizada foi de *Staphylococcus aureus* (CBAM 0026) obtida a partir da “Coleção de Bactérias da Amazônia – Instituto Oswaldo Cruz (Manaus, Brasil)” e cultivada em ágar nutriente em uma temperatura de 35 °C por 24 horas, sendo posteriormente preservada em glicerol (20%) a -80 °C. A padronização do inóculo bacteriano foi preparada com a suspensão de quatro colônias isoladas em solução fisiológica (NaCl 0,9%) e incubada a 35 °C até atingir 0,5 na escala de Macfarland. Em seguida, a suspensão foi inoculada em placas contendo ágar Mueller-Hinton, inserindo discos impregnados com água deionizada como controle negativo, discos impregnados com Amicacina (30 μg) como controle positivo e discos impregnados com extrato de camomila. Por fim, as placas foram incubadas por 24 horas a 35 °C e os halos foram contabilizados através de um paquímetro.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A partir de 80 g de camomila seca, triturada e peneirada, após processo de extração com etanol, evaporação rotativa e liofilização, foram obtidos 2 g de extrato vegetal concentrado seco, conforme Figura 1a e após suspensão em água ultrapura Figura 1b.

Figura 1 – Extrato de camomila: a) seco concentrado; b) suspenso

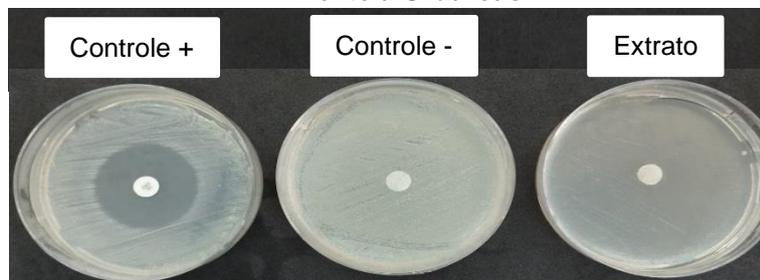


Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Conforme Figura 2, o teste de suscetibilidade a antimicrobianos apresentou um halo de inibição de $24,74 \pm 0,4$ mm para o controle positivo, desta forma, a cepa de *S. aureus* foi considerada como suscetível ao antibiótico testado. Em contrapartida, o controle negativo e extrato de camomila não apresentaram nenhuma atividade antimicrobiana.

Através de curva padrão de DPPH, preparada com 8 pontos, variando de 100 a 2000 $\mu\text{mol/L}$, verificou-se a concentração de antioxidantes nas amostras, que indicaram a diminuição da concentração de antioxidantes do extrato concentrado, de 21% após 24 horas em contato com os biofilmes e 23% após 144 horas, uma diferença de 2% entre os dois pontos coletados. Já para o extrato diluído, verificou-se comportamento diferente, no qual a concentração diminuiu apenas 8% após 24 horas e 18% após 144 horas. Essa diminuição de antioxidantes pode indicar a incorporação dos princípios ativos pelos biofilmes de NCB.

Figura 2 – Atividade antimicrobiana do extrato frente a *S. aureus*



Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

CONCLUSÕES

O presente trabalho tinha como objetivo obter o extrato de camomila e avaliar sua incorporação em biofilmes de NCB, bem como, sua atividade antimicrobiana e antioxidante. Através dos resultados obtidos, pode-se verificar que, além do extrato de camomila apresentar atividade antioxidante, os biofilmes de NCB apresentam potencial para incorporação do extrato, já que após 24 horas em contato com o extrato diluído, diminuiu-se a concentração de antioxidantes em cerca de 21%. Diferentes métodos de verificação de atividade antioxidante podem ser empregados em futuros estudos, além da verificação de mudanças estruturais nos biofilmes após contato com o extrato. Além disso, verificou-se que o extrato não apresentou atividade antimicrobiana frente a *S. aureus*, porém futuras avaliações devem ser realizadas com diferentes microrganismos para confirmar a eficiência do extrato para esta finalidade. Tais resultados indicam que o extrato de camomila apresenta bom potencial de atividade antioxidante, além de reforçar a possibilidade de combinar o extrato à um suporte de NCB para carreamento de princípios ativos.

Agradecimentos

Agradeço a Fundação Araucária pelo suporte financeiro através da concessão da bolsa.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

BAYOUB, K. *et al.* Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 27, p. 4251–4258, 5 jul. 2010.

BRAIBANTE, M. E. F. *et al.* A Química dos Chás. **Química Nova na Escola**, v. 36, n. 3, p. 168–175, ago. 2014.



CARVALHO, C. R. S. de. **POTENCIAL ANTIOXIDANTE E TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS DOS CHÁS DE HORTELÃ (*Mentha spicata*), CAMOMILA (*Matricaria chamomilla*) e CAPIM-CIDREIRA (*Cymbopogon citratus*)**. 2019. Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2019.

DAVIENNE, K. F.; RADDI, G.; POZETTI, G. L. Das plantas medicinais aos fitofármacos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 3, p. 11–14, 1 jun. 2004.

FERNANDES, I. de A. A. *et al.* The role of bacterial cellulose loaded with plant phenolics in prevention of UV-induced skin damage. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 2, p. 100122, dez. 2021.

FISCHER, M. R. *et al.* Biossíntese e caracterização de nanocelulose bacteriana para engenharia de tecidos. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 22, n. suppl 1, 8 jan. 2018.

HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. **Biochemical Journal**, v. 58, n. 2, p. 345–352, 1 out. 1954.

LIMA, J. Fi. As Plantas na História da Dor. **Revista Da Sociedade Portuguesa De Anestesiologia**, v. 22, n. 4, p. 126–133, 2013.

MARQUES, L. C. Preparação de extratos vegetais. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v. 3, n. 2, p. 74–76, 2005.

MENSOR, L. L. *et al.* Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127–130, mar. 2001.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests National Committee for Clinical Laboratory Standards - Approved Standard: M2-A8**, 2003.

PHIMNUAN, P. *et al.* Development of Anti-Acne Film from Bio-Cellulose Incorporating Punica granatum Peel Extract. **Walailak Journal of Science and Technology (WJST)**, v. 16, n. 10, p. 765–778, 15 maio 2018.

ROCHA, L. P. B. da *et al.* Uso de plantas medicinais: Histórico e relevância. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, 5 ago. 2021.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–178, 1 jan. 1999. . Acesso em: 4 set. 2023.

VEGGI, P. C. **Obtenção de extratos vegetais por diferentes métodos de extração: estudo experimental e simulação dos processos**. 2009. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, Campinas, 2009.