

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO LIPÍDICO OBTIDO DA CASCA DE NÓZ-PECÃ (*Carya illinoensis*)

CAREN WILSEN MIRANDA COELHO WANDERLEY¹; IVANDRA IGNÊS DE SANTI²; MAELE COSTA DOS SANTOS³; DÉBORA RODRIGUES⁴; PATRÍCIA OLIVEIRA SCHIMITT⁵; DARCI ALBERTO GATTO⁶

¹ Universidade Federal de Pelotas – carenwilsen@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – ivandra.santi@yahoo.com.br

³ Universidade Federal de Pelotas – maeledossantoseq@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – deborar999@hotmail.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas – patty_olmitt@hotmail.com

⁶ Universidade Federal de Pelotas – darcigatto@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Mundialmente famosa por suas nozes e óleo de alta qualidade a noqueira-pecã (*Carya illinoensis*) é uma das principais espécies produtoras de nozes (noz-pecã), também conhecido como pecan, é uma das árvores lenhosas e frutíferas mais importantes do mundo (BHARDWAJ; SHARMA, 2017) Geograficamente a noz-pecã é nativa da América do Norte e sua cultura é bastante difundida no sul dos Estados Unidos e México, juntos eles fornecem 92% da produção mundial de noz-pecã (INC, 2019).

No Brasil, estima-se que, em 2018, a produção em território nacional tenha sido de aproximadamente, 7,3 mil toneladas em uma área de cerca de 3,8 mil hectares (IBGE, 2018) predominantemente no estado do Rio Grande do Sul que é o maior produtor nacional, com cerca de 74% da produção brasileira, obteve produção de 3.480 toneladas de noz-pecã neste mesmo ano (SEAPDR, 2020).

Diante deste cenário, a quantidade de resíduos de noqueira-pecã gerados como resultado dos processos de colheita e processamento industrial tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. Neste sentido, grandes quantidades de materiais residuais são produzidas a partir do processamento das nozes em indústrias e nos processos de colheita. o que acarreta altos volumes destes elementos no ambiente (FLORES-ESTRADA et al., 2019).

O desperdício da casca da noz-pecã pode causar poluição ambiental e desperdício de recursos (RES et al., 2018) de uma matéria prima de alto valor agregado (MATTOS et al., 2019). É um cenário bastante preocupante, considerando-se que até 80% do peso total das nozes é referente a resíduos, caracterizados como bioprodutos de grande potencial (SANTOS, 2020).

Pesquisas realizadas avaliando a atividade antimicrobiana presente na casca de nozes de diferentes espécies são reportados na literatura para alguns microorganismos (BABU et al., 2013; PRADO, 2013; RASTALL; GIBSON, 2019).

Este estudo tem por objetivo realizar a avaliação antimicrobiana do extrato lipídico obtido da casca de noz-pecã de *Carya illinoensis* para os patógenos *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae*. A utilização desse resíduo como recurso biosustentável podem fomentar vantagens ambientáveis, econômicas e sociais.

2. METODOLOGIA

Extração de Lipídeos

Neste método, foram transferidas 10 g da casca de noz-pecã seca, *in natura* e previamente triturada em moinho de facas para um cartucho poroso introduzido na câmara de extração de Soxhlet, como solvente utilizou-se Hexano. Extraiu-se por 6 horas em temperatura moderada (faixa de ebulição 68-70 °C), ao término da extração o solvente foi evaporado em aparelho Rota evaporador (Laborata 4002- Control) e após obtido o extrato lipídico foi armazenado em frasco hermeticamente fechado e conservado a -4°C para análises posteriores (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

Avaliação da Atividade Biológica

Para realização deste estudo foram utilizadas duas bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 51299) e duas bactérias gram-negativa (*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603) fornecidas pela coleção de microrganismos da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (MBC)

Para determinar a MIC foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo de acordo com as normas instituídas pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute (2008), com modificações. Para a realização do teste, foi utilizada uma microplaca de poliestireno estéril com 96 cavidades (Kasvi®). Os lipídeos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,5% antes de serem adicionados nas microplacas. Após isso, as amostras foram diluídas nas microplacas, atingindo concentrações que variaram de 0.0078 mg/mL a 1 mg/mL. Como controle de esterilidade foi utilizado 100µL do meio com emulsificante DMSO e como controle de crescimento microbiano 50 µL do meio de crescimento (BHI) e 50µL da suspensão bacteriana. Além disso, foi realizado o controle de esterilidade dos ácidos graxos testados.

As cepas microbianas foram padronizadas, no qual foram suspensas em solução salina (0,9%) até atingir a escala padrão de 0.5 de McFarland, para isso, foi realizada a leitura da densidade óptica dos inóculos e eles foram lidos em um espectrofotômetro com comprimento de onda de 630 nm até atingir uma absorbância entre 0,08 - 0,10. Posteriormente, a suspensão bacteriana foi ajustada para obter uma concentração final de 3×10^4 UFC/mL⁻¹. O caldo BHI foi utilizado para o crescimento e diluição das suspensões bacterianas. Por fim, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h.

Transcorrido o período de incubação, verificou-se o crescimento microbiano adicionando 20 µL do corante revelador Resazurina a 0,02% (Sigma-Aldrich®) em todas as cavidades. Na leitura, o surgimento da coloração rosa indicou viabilidade bacteriana, sendo assim possível determinar a concentração inibitória mínima (CIM).

A partir dos resultados da CIM, alíquotas de 5 µL de cada uma das cavidades foram plaqueadas em ágar BHI. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 24h. A ausência de crescimento bacteriano no meio de cultivo indica que os lipídeos testados não apresentaram atividade bacteriostática e sim bactericida.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão representados na Tabela 1.

Tabela 1: Atividade antimicrobiana do Extrato Lipídico obtido da Casca de Noz-Pecã (*Carya illinoensis*)

Amostra	Concentração	S.a		A.b.		E.f.		K.p.	
		MIC	CBM	MIC	CBM	MIC	CBM	MIC	CBM
Extrato	1mg/mL	-	+	-	-	+	+	+	+
Lipídico da	0,5mg/mL	+	+	-	-	+	+	+	+
Casca (noz- pecã)	0,25mg/mL	+	+	-	-	+	+	+	+
	0,125 mg/mL	+	+	-	-	+	+	+	+
	0,0625 mg/mL	+	+	-	-	+	+	+	+

Legenda: (-) inibição antibacteriana; (+) crescimento bacteriano; M: Concentração Inibitória Mínima; B: Concentração Bactericida Mínima; A.b.: *Acinetobacter baumannii*; K.p.: *Klebsiella pneumoniae*; E.f.: *Enterococcus faecalis*; S.a.: *Staphylococcus aureus*.

Ao analisar a Tabela 1 é possível constatar que o extrato lipídico obtido a partir da casca de noz-pecã, apresentou atividade bacteriostática e bactericida 100% eficaz para *Acinetobacter baumannii* sob concentração de 0,0625 mg/ml à 1 mg/ml. Esse patógeno é causador de infecções significativas que ameaçam a vida. Para se ter uma ideia ele está lista de patógenos prioritários da Organização Mundial da Saúde (OMS) para pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos, onde é designado como patógeno 1-crítico prioritário. Segundo Neshet (2022), o *Acinetobacter baumannii* representa um desafio terapêutico significativo devido à falta de opções de tratamento estabelecidas, pois poucos agentes antimicrobianos disponíveis atualmente estão ativos contra eles.

Além disso, o extrato apresentou atividade bacteriostática para *Staphylococcus aureus* na concentração de 1 mg/ml, o que é importante pois as infecções por essa bactéria são particularmente problemáticas devido à alta incidência de infecções complicadas associadas (BAMBERGER, 2005).

O estudo também demonstrou ineficácia do extrato lipídico da casca de noz-pecã para os patógenos *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus faecalis*, nas concentrações indicadas, onde em todos os casos houve atividade microbiana proliferativa.

Além das propriedades aqui apresentadas, outros estudos demonstrados na revisão feita por Res. et al. (2018) e Prado (2013), comprovam atividades farmacológicas, anticarcinogênicas, antidiabéticas da casca de noz-pecã, considerada a “Rainha das Nozes” e indicam que a casca de noz possui inúmeras bioatividades antimicrobiana, antioxidante, anticancerígena, entre outros efeitos.

4. CONCLUSÕES

O extrato lipídico obtido a partir da casca de noz-pecã apresentou atividade antibacteriana significativa principalmente contra *Acinetobacter baumannii* e para *Staphylococcus aureus*, que são patógenos clínicos resistentes a antibióticos, o que implica que a partir desse subproduto residual podem ser desenvolvidos bioprodutos estéreis úteis para aplicações alimentícias, médicas, agrícolas e pecuárias, de um benefício econômico significativo através de uma alternativa sustentável. Sugere-se a identificação dos constituintes desse para maximizar sua utilização.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brasil. Farmacopeia Brasileira, volume 1 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: **Anvisa**, 2010. 525p., 1v/il
- BABU, D. et al. Efficacy of antimicrobials extracted from organic pecan shell for inhibiting the growth of listeria spp. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 12, p. 1899–1903, 2013.
- BHARDWAJ, E.; SHARMA, D. Medicinal and therapeutic properties of pecan (*Carya illinoensis*). **International Journal of Herbal Medicine**, v. 5, n. 6, p. 01–03, 2017.
- BAMBERGER, M.D., AND SARAH E. BOYD, M. . Management of Staphylococcus aureus Infections - American Family Physician. **American Family Physician**, v. 72, n. 12, p. 2474–2481, 2005.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2006). Reference Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Document M7-A7, **Approved Standard**, 7th Edn. Wayne, PA.
- FLORES-ESTRADA, R. A. et al. Chemical Composition, Antioxidant, Antimicrobial and Antiproliferative Activities of Wastes from Pecan Nut [*Carya illinoensis*]. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, n. 7, p. 3419–3432, 2019.
- HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl from lipids. **Laboratory Practice**, London, v. 22, n. 3, p. 475-473, 1973.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). 2018. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em 28 jul. 2022.
- INTERNATIONAL NUT AND DRIED FRUIT COUNCIL FOUNDATION (INC). Nuts and Dried Fruits: Statistical Yearbook 2018/2019. Disponível em: <https://www.nutfruit.org/files/tech/1553521370_INC_Statistical_Yearbook_2018.pdf>. Acesso em: 14 jul. 2022.
- KOCH, K.; RÁBAGO-PANDURO, L. M.; PEÑA, M. M. Changes in bioactive compounds content and antioxidant capacity of pecan nuts [*Carya illinoensis*]. **Revista Mexicana de Ingeniería Química Changes**, v. 19, n. 3, p. 1439–1452, 2020.
- MATTOS, C. et al. Biocidal applications trends of bio-oils from pyrolysis: Characterization of several conditions and biomass, a review **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis. Elsevier B.V.**, , 1 maio 2019.
- PRADO, A. C. P. DO. Identificação e avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de compostos fenólicos da casca de noz-pecã [*Carya illinoensis* (wangenh) C . Koch]. p. 244, 2013.
- RES, M. et al. Minireview Phytochemical Compositions and Bioactivities of Minireview. **Med. Res.**, v. 2, p. 1–6, 2018.
- SANTOS, M. S. N. Hidrólise Subcrítica de biomassas residuais de nogueira-pecã: caracterizações físico-química, morfológicas e obtenções de açúcares redutores. **Universidade Federal de Santa Maria**, p. 1–96, 2020.
- SEAPDR. NOTA TÉCNICA: NOZ PECÃ NO RS. **Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural**, 2020.