

## ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DO EXTRATO ACETÔNICO DE *THEOBROMA CACAOL.*, VARIEDADE NACIONAL MODERNA, SOBRE CEPAS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* E *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTENTE À METICILINA (MRSA)

ANTIMICROBIAL AND ANTIBIOFILM ACTIVITY OF THE ACETONE EXTRACT OF *THEOBROMA CACAOL.*, MODERN NACIONAL VARIETY, AGAINST STRAINS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AND METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA)

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIBIOFILM DEL EXTRACTO ACETÓNICO DE *THEOBROMA CACAOL.*, VARIEDAD NACIONAL MODERNA, FRENTE A CEPAS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* Y *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTENTE A METICILINA (MRSA)

Yasmin Santos de Jesus<sup>1</sup>  
Francine Novais Souza<sup>2</sup>  
Macon Gama Oliveira<sup>3</sup>  
Regineide Xavier Santos<sup>4</sup>

## RESUMO

Plantas produzem metabólitos secundários com propriedades farmacológicas, destacando-se como alternativas no combate a microrganismos patogênicos. O objetivo deste estudo foi relatar o perfil fitoquímico e avaliar as atividades antibacteriana e antibiofilme do extrato acetônico das folhas de *Theobroma cacao* L., variedade Nacional moderna, frente às cepas patogênicas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). A caracterização fitoquímica do extrato foi realizada por triagem fitoquímica baseada em reações colorimétricas para detecção de metabólitos secundários. A atividade antibacteriana do extrato foi avaliada contra *Pseudomonas aeruginosa* e MRSA por meio de ensaio em microplacas, utilizando diferentes concentrações do extrato e leitura de densidade óptica a 630 nm após 24h de incubação. A formação de biofilme foi determinada pelo método do cristal violeta. A inibição do crescimento bacteriano e da formação de biofilme foram calculadas em relação ao controle de crescimento, e os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), e a concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) foi estimada por regressão linear. Foi observada a presença de alcaloides, taninos catequicos, flavonoides e antraquinonas no extrato. Os ensaios antimicrobianos revelaram maior atividade do extrato contra *P. aeruginosa* na concentração de 1000 µg/ml, inibindo 76,2% do crescimento bacteriano e IC<sub>50</sub> de 529 µg/ml, com ação antibiofilme moderada, embora sem relação dose-dependente, possivelmente devido à agregação molecular de metabólitos secundários em concentrações mais elevadas. Em relação ao MRSA, observou-se 54,3% de inibição do crescimento bacteriano na concentração de 1000 µg/ml, com IC<sub>50</sub> de 929 µg/ml, porém sem efeito significa-

tivo na inibição de biofilmes. Esses achados indicam que o extrato das folhas de *T. cacao* apresenta potencial como fonte de compostos bioativos.

## PALAVRAS-CHAVE

Extrato vegetal; Cacau; Bactéria patogênica; Biofilme bacteriano.

## ABSTRACT

Plants produce secondary metabolites with pharmacological properties, standing out as alternatives in the fight against pathogenic microorganisms. The objective of this study was to report the phytochemical profile and evaluate the antibacterial and antibiofilm activities of the acetone extract from the leaves of *Theobroma cacao* L., modern Nacional variety, against pathogenic strains of *Pseudomonas aeruginosa* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). The phytochemical characterization of the extract was performed by phytochemical screening based on colorimetric reactions for the detection of secondary metabolites. The antibacterial activity of the extract was evaluated against *Pseudomonas aeruginosa* and MRSA by means of a microplate assay, using different concentrations of the extract and optical density reading at 630nm after 24h of incubation. Biofilm formation was determined by the crystal violet method. The inhibition of bacterial growth and biofilm formation were calculated in relation to the growth control. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test ( $p < 0.05$ ), and the 50% inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) was estimated by linear regression. The presence of alkaloids, catechic tannins, flavonoids and anthraquinones in the extract was observed. Antimicrobial assays revealed greater activity of the extract against *P. aeruginosa* at the concentration of 1000  $\mu\text{g/ml}$ , inhibiting 76.2% of bacterial growth and an  $IC_{50}$  of 529  $\mu\text{g/ml}$ , with a moderate antibiofilm activity, although without a dose-dependent relationship, possibly due to the molecular aggregation of secondary metabolites at higher concentrations. Regarding MRSA, 54.3% inhibition of bacterial growth was observed at the concentration of 1000  $\mu\text{g/ml}$ , with an  $IC_{50}$  of 929  $\mu\text{g/ml}$ , however without significant effect on biofilm inhibition. These findings indicate that the extract from the leaves of *T. cacao* presents potential as a source of bioactive compounds.

## KEYWORDS

Plant extract; Cocoa; Pathogenic bacteria; Bacterial biofilm.

## RESUMEN

Plantas producen metabolitos secundarios con propiedades farmacológicas, destacándose como alternativas en el combate contra microorganismos patógenos. El objetivo de este estudio fue reportar el perfil fitoquímico y evaluar las actividades antibacteriana y antibiofilm del extracto acetónico de las hojas de *Theobroma cacao* L., variedad Nacional moderna, frente a cepas patógenas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA). La caracterización fitoquímica del extracto se realizó mediante un tamizaje basado en reacciones colorimétricas para la detección de metabolitos secundarios. La actividad antibacteriana fue evaluada contra *P. aeruginosa* y MRSA mediante un ensayo en microplacas, utilizando diferentes concentraciones del extracto y lectura de densidad óptica a 630nm después de 24h de incubación. La formación de biofilm fue determinada mediante el método del cristal violeta. La inhibición del crecimiento bacteriano y de la formación de biofilm fueron calculadas en relación con el control de crecimiento. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ), y la concentración inhibitoria del 50% ( $IC_{50}$ ) fue estimada mediante regresión lineal. Se observó la presencia de alcaloides, taninos catequicos, flavonoides y antraquinonas en el extracto. Los ensayos antimicrobianos revelaron mayor actividad del extracto contra *P. aeruginosa* en la concentración de 1000  $\mu\text{g/ml}$ , inhibiendo el 76,2% del crecimiento bacteriano y una  $IC_{50}$  de 529  $\mu\text{g/ml}$ , con moderada acción antibiofilm, aunque sin una relación dosis-dependiente, posiblemente debido a la agregación molecular de metabolitos secundarios a mayores concentraciones. En relación con MRSA, se observó un 54,3% de inhibición del crecimiento bacteriano en la concentración de 1000  $\mu\text{g/ml}$ , con una  $IC_{50}$  de 929  $\mu\text{g/ml}$ , sin embargo sin efecto significativo en la inhibición de biofilms. Estos resultados indican que el extracto de hojas de *T. cacao* presenta potencial como fuente de compuestos bioactivos con actividad antibacteriana.

## PALABRAS CLAVE

Extracto vegetal; Cacao; Bacterias patógenas; Biopelícula bacteriana.

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas sintetizam diversos metabólitos secundários (RAVEN *et al.*, 2014) com propriedades farmacológicas notáveis, como as atividades anticarcinogênica, antialérgica e antioxidante (SOMAT *et al.*, 2025). Além disso, representam uma alternativa promissora no combate a microrganismos patogênicos (NASCIMENTO *et al.*, 2022) e biofilmes bacterianos (SHAMIM *et al.*, 2023).

Biofilmes são comunidades de microrganismos encontradas em tubulações de água potável (ALMEIDA *et al.*, 2019), plásticos (GALUTTI *et al.*, 2023) e em dispositivos médicos, como catéteres, nos

quais podem se estabelecer no interior do hospedeiro com a possibilidade de desencadear quadros de infecções (CANGUI-PANCHI *et al.*, 2022). Sua formação é coordenada pelo quorum sensing (QS), um sistema de comunicação que envolve a produção, liberação e detecção de moléculas que regulam comportamentos bacterianos coletivos (WU; LUO, 2021).

A presença dessas comunidades gera impactos econômicos e clínicos significativos (TRENTIN *et al.*, 2013), pois a matriz extracelular que os envolve (HALL-STOODLEY *et al.*, 2004) atenua a ação de antimicrobianos e os protege contra respostas imunes (ZHANG *et al.*, 2020). Bactérias como *Staphylococcus aureus* e sua forma resistente à meticilina (MRSA) representam riscos para a saúde humana, devido às suas capacidades de produzir biofilme (CRAFT *et al.*, 2019), secretar enzimas que atacam o sistema imunológico do hospedeiro e estarem associadas ao desenvolvimento e/ou progressão de doenças autoimunes. Podem, ainda, expressar mecanismos de resistência a biocidas, como o espessamento da parede celular (CHEN *et al.*, 2022), com MRSA apresentando fenótipos de resistência (AMÂNCIO *et al.*, 2021).

Nesse contexto, as propriedades das plantas são amplamente exploradas nas pesquisas. Estudos com *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson (erva-cidreira) revelaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* (OLIVEIRA *et al.*, 2018). De forma similar, *Ginkgo biloba* L. (ginkgo) foi reconhecido como um antibacteriano eficaz, inibindo o crescimento de *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus* (WANG *et al.*, 2022).

Embora as pesquisas revelem progressos no conhecimento dos potenciais antimicrobiano e antibiofilme de espécies vegetais, a ampla biodiversidade vegetal ainda oferece muitas oportunidades de descoberta. Diante desse cenário, o Brasil conta com cerca de 35 mil espécies de angiospermas (BFG, 2020), indicando alta capacidade de prospecção de compostos bioativos eficazes e sustentáveis (Valli *et al.*, 2018).

Dentre as espécies vegetais, destaca-se a *Theobroma cacao* L., o cacaueteiro, pertencente à família botânica Malvaceae (COLLI-SILVA *et al.*, 2025). Trata-se de uma árvore perene de pequeno porte, com folhas alongadas e fruto amplamente explorado comercialmente (GALVÃO *et al.*, 2024). O cacau é classificado em três variedades principais: Criollo, Forasteiro e Trinitário (JEAN-MARIE *et al.*, 2022), além da variedade Nacional, oriunda do Equador, cuja forma “Nacional moderna” resulta de modificações genéticas que originaram populações híbridas (FOUET *et al.*, 2022). A partir das suas sementes, o chocolate e a manteiga-de-cacau são produzidos (COLLI-SILVA *et al.*, 2025), sendo o fruto utilizado, ainda, na produção de cosméticos (HALIM *et al.*, 2020).

No entanto, o valor do *T. cacao* vai além do uso apenas da indústria alimentícia. Propriedades antioxidante (FAJARDO *et al.*, 2022), antibacteriana (RAHAYU *et al.*, 2023), anticancerígena e potencialmente antimetastáticas em células cancerígenas (SITAREK *et al.*, 2024) do seu extrato são relatadas. Isso se dá devido a presença de metabólitos em sua estrutura (GALVÃO *et al.*, 2024), reforçando a importância da caracterização fitoquímica para a identificação de compostos bioativos.

A extração desses compostos depende diretamente do solvente utilizado. Nos estudos que exploram a atividade biológica de *T. cacao*, os solventes mais empregados são etanol (RAHAYU *et al.*, 2023) e metanol (YAHYA *et al.*, 2022), devido à sua eficiência na extração de compostos fenólicos e flavo-

noides (MEHMOOD *et al.*, 2022). Entretanto, solventes menos utilizados como a acetona também são eficazes, já tendo sido empregados na extração dos compostos presentes na *Vassobia breviflora* (Sendtn.) Hunz. (esporão-de-galo) (VIANA *et al.*, 2023).

Apesar disso, observa-se uma lacuna na literatura quanto à exploração do potencial antimicrobiano da variedade Nacional moderna (var. Nacional mod.) de *T. cacao*. Assim, o presente estudo objetivou analisar o perfil fitoquímico e avaliar as atividades antibacteriana e antibiofilme do extrato acetônico das folhas de *T. cacao* var. Nacional mod. frente às cepas patogênicas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA).

## 2. MÉTODOS

### 2.1. MATERIAL PARA ANÁLISE

As culturas de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (ATCC 43300) foram cedidas pelo laboratório de Bioquímica e Genética Médica, localizado na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* de Vitória da Conquista, Bahia.

O extrato acetônico das folhas de *Theobroma cacao* L. da variedade Nacional moderna foi cedido pelo laboratório de Biotecnologia Microbiana (VIP-BA) localizado na Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), *campus* de Ilhéus, Bahia.

### 2.2. ANÁLISE FITOQUÍMICA

A caracterização fitoquímica do extrato acetônico das folhas de *T. cacao* ocorreu seguindo as metodologias adaptadas de Silva (2010) e Raaman (2006), com a confirmação da presença/ausência dos bioativos de acordo com a análise visual das mudanças de coloração e formação de precipitado.

Para a confirmação dos alcaloides, foram dissolvidos 2 mg do extrato seco em 5 mL de solução de HCl a 5%, e dessa solução foi separada uma porção de 1 mL onde foram adicionados 60 µL do reativo de Bouchardat. A formação de um precipitado laranja avermelhado indica a presença de alcaloides.

Para a determinação dos taninos foram dissolvidos 4 mg de extrato seco em 5 mL de água destilada. Em seguida, foram adicionadas de 1 a 10 gotas de solução alcoólica de FeCl<sub>3</sub> a 1%. A formação de um precipitado verde indica a presença de taninos catéquicos. A detecção de flavonoides se deu pela dissolução de 2 mg do extrato em 1 mL de água destilada, com a adição de 2 gotas de uma solução neutra de cloreto férrico (5%). A mudança de coloração da solução para o verde escuro indica a presença de flavonoides.

Para proteínas e aminoácidos, foram dissolvidos 4 mg de extrato em 3 mL de água destilada, com a adição de 0,5 mL de solução aquosa de Ninhidrina a 1%. A solução foi aquecida até a ebulição. A mudança de coloração da solução para violeta indica a presença de proteínas e aminoácidos.

Na determinação das saponinas, 2 mg do extrato foram dissolvidos em 5 mL de água destilada. Essa solução foi diluída, então, em 15 mL e agitada vigorosamente por 2 minutos. A permanência da camada de espuma por mais de 30 minutos indica a presença de saponinas.

O procedimento na determinação das antraquinonas se deu por meio da adição de 2 g do extrato em 50  $\mu\text{L}$  de NaOH 1M. A mudança de coloração da solução para o vermelho indica a presença de antraquinonas.

### 2.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A análise antibacteriana foi conduzida segundo a metodologia proposta pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). As cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) foram reativadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion). Posteriormente, as colônias foram cultivadas em meio Ágar *Mueller-Hinton* e incubadas a 37°C por 24 horas em estufa. Após o crescimento, as culturas foram suspensas em solução salina (NaCl 0,9%), sendo realizada a padronização por meio de leitura de absorbância, sendo adotado o padrão 0,5 da escala de McFarland, correspondente a uma concentração celular de 10 UFC/mL (FILOCHE *et al.*, 2005).

Para cada cepa bacteriana foram preparadas três microplacas de poliestireno, onde testou-se o extrato de *T. cacao* nas concentrações de 1 (T1), 10 (T2), 100 (T3) e 1000 (T4) microgramas por mL. Os poços foram preenchidos de forma a conter 80  $\mu\text{L}$  do extrato teste, 40  $\mu\text{L}$  de meio de cultura TSB (Tryptic Soy Broth) e 80  $\mu\text{L}$  de inóculo bacteriano. Os poços de controle negativo (CN) foram formados por 40  $\mu\text{L}$  de meio TSB e 160  $\mu\text{L}$  de solução salina, com o objetivo de verificar possíveis contaminações ou interferências experimentais. O controle de crescimento (CC) foi formado por 40  $\mu\text{L}$  de TSB, 80  $\mu\text{L}$  de inóculo e 80  $\mu\text{L}$  de água destilada, empregada para substituir o extrato teste, sem interferir no desenvolvimento bacteriano. Todos os poços apresentaram valor final de 200  $\mu\text{L}$ .

As placas foram submetidas à leitura de absorbância a 630 nm (tempo zero) e, após incubação a 37°C por 24 horas, foi realizada uma segunda leitura no mesmo comprimento de onda.

### 2.4. TESTE DO BIOFILME

A adesão bacteriana e formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (ATCC 43300), espécies com capacidade de formar biofilme (PERICOLINI *et al.*, 2018; CRAFT *et al.*, 2019), foram avaliadas segundo o ensaio do cristal violeta, conforme protocolo adaptado de Trentin *et al.* (2011), que permite a detecção da biomassa de biofilme aderida às superfícies das microplacas de poliestireno.

O conteúdo das placas utilizadas na seção anterior foi removido e os poços lavados três vezes com solução salina estéril, procedimento realizado em duplicata. Então, foram adicionados 150  $\mu\text{L}$  de metanol (P.A) em cada poço, permanecendo por 20 minutos para fixação. Após esse período, o metanol foi descartado e as placas mantidas invertidas à temperatura ambiente por 24h.

Para a coloração da camada de biofilme aderida, adicionou-se 150  $\mu\text{L}$  de cristal violeta (0,5%) em cada poço, com tempo de exposição de 15 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, o excesso de cristal violeta foi removido por tripla lavagem de cada poço com água destilada. O corante ligado às células bacterianas aderidas foi solubilizado com 150  $\mu\text{L}$  de etanol a 95%. Após esse procedimento, foi realizada a leitura da densidade óptica no espectrofotômetro, em 630 nm.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e ocorreram nos laboratórios de Biologia Geral, Microbiologia Básica e Aplicada e Bioquímica e Genética Médica da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, campus de Vitória da Conquista, Bahia.

## 2.5. ANÁLISE DE DADOS

As porcentagens de inibição do crescimento bacteriano e da formação do biofilme foram calculadas em relação ao controle de crescimento (CC) utilizando as medições da DO630 por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Inibição de Biofilme (\%)} = \frac{\text{DO}_{630} \text{ (controle CP)} - \text{DO}_{630} \text{ (tratamento)}}{\text{DO}_{630} \text{ (controle CP)}} \times 100$$

Onde:

DO: densidade óptica.

A análise estatística foi realizada no programa R (R CORE TEAM, 2025), utilizando o teste ANOVA de uma via para verificar se existem diferenças no crescimento bacteriano e na formação de biofilme entre as diferentes concentrações do extrato. Com resultados significativos da ANOVA, o teste de Tukey foi aplicado para verificar quais concentrações diferem entre si. Para ambos testes consideramos um valor de  $p < 0,05$ .

Para calcular a Concentração Inibitória de 50% ( $IC_{50}$ ), foi ajustada uma regressão linear entre a porcentagem de inibição e a concentração do extrato. Com a equação da reta  $y = ax + b$ , estimamos o  $IC_{50}$  resolvendo a equação para  $y = 50$ .

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO

Os resultados dos testes de análise fitoquímica do extrato acetônico das folhas de *T. cacao* L. detectaram a presença dos compostos bioativos alcaloides, taninos catequicos, flavonoides e antraquinonas (Tabela 1).

**Tabela 1** - Compostos bioativos presentes no extrato acetônico das folhas de *Theobroma cacao* L., onde (+) reagente e (-) não reagente.

Compostos	Reagentes	Resultado
Alcaloides	Bouchardat	+
Taninos catequicos	Solução alcoólica de $FeCl_3$ a 1%	+
Flavonoides	Solução neutra de cloreto férrico (5%)	+
Proteínas e aminoácidos	Ninhidrina a 1%	-
Saponinas		-
Antraquinonas	NaOH 0,5M	+

Fonte: Dados da pesquisa.

As classes metabólicas detectadas no extrato foliar de *T. cacao* estão de acordo com aquelas descritas na literatura para a espécie. Parbuntari *et al.* (2018) identificaram, por meio de testes fitoquímicos, a presença de alcaloides, flavonoides e terpenoides. De forma complementar, Llerena *et al.* (2023) analisaram a mucilagem e as cascas de grãos de cacau da variedade Nacional × Trinitário e relataram a presença de polifenóis, flavonoides, catequina, cafeína e teobromina.

Os resultados evidenciam que o extrato das folhas do cacau apresenta metabólitos secundários conhecidos pelas suas propriedades antibacterianas. Por exemplo, os alcaloides, que inclui a morfina, cafeína e nicotina (RAVEN *et al.*, 2014), são compostos orgânicos nitrogenados (BORGES; AMORIM, 2020) que apresentam toxicidade contra células bacterianas (SCHLÄGER; DRÄGER, 2016). Os taninos e flavonoides também apresentam atividade antibacteriana (PACZKOWSKI *et al.*, 2017; TONG *et al.*, 2022). Já as antraquinonas apresentam uma variedade de propriedades farmacológicas, dentre elas a atividade antibacteriana e antiinflamatória (QUN *et al.*, 2023).

Embora os testes fitoquímicos colorimétricos sejam úteis para a determinação de metabólitos secundários de um extrato, além de apresentarem baixo custo, fácil execução e interpretação dos resultados baseada na observação de mudanças na coloração e/ou formação de precipitado, estudos futuros podem utilizar técnicas mais avançadas para colaborar com esses resultados. Métodos cromatográficos, como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e os métodos espectroscópicos, com a utilização da luz ultravioleta (UV), são tecnologias utilizadas na detecção e quantificação dos compostos bioativos que compõem o extrato (MAHESHWARAN *et al.*, 2024). A aplicação desses métodos pode contribuir para a compreensão do perfil fitoquímico completo de um extrato vegetal, além de possibilitar aplicações farmacológicas futuras.

### 3.2. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME

O extrato apresentou eficiência variável contra as cepas bacterianas em todas as concentrações testadas (1, 10, 100 e 1000 µg/ml) em comparação com o controle de crescimento (CC). A Tabela 2 apresenta as taxas de inibição do crescimento bacteriano e da formação do biofilme pelo extrato testado.

Em relação a concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>), a equação obtida para MRSA foi  $y = 0,0468x + 6,55$ , com  $R^2 = 0,85$ . Para *P. aeruginosa*, a equação da reta foi  $y = 0,0589x + 18,8$ , com  $R^2 = 0,81$ .

**Tabela 2** - Taxas de inibição do crescimento bacteriano e da formação do biofilme de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) e *Pseudomonas aeruginosa* e a concentração inibitória IC<sub>50</sub> de *Theobroma cacao* L.

Inibição	Espécie bacteriana	Extrato <i>T. cacao</i>				IC <sub>50</sub>
		1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	1000 µg/ml	
Crescimento bacteriano (%)	MRSA	16,3 ± 0,024	13,4 ± 0,038	0,7 ± 0,039	54,3* ± 0,045	929 µg/ml
	<i>P. aeruginosa</i>	17,3* ± 0,043	23,7* ± 0,042	38,4* ± 0,032	76,2* ± 0,026	529 µg/ml

Inibição	Espécie bacteriana	Extrato <i>T. cacao</i>				IC <sub>50</sub>
		1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	1000 µg/ml	
Formação de biofilme (%)	MRSA	-	-	-	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	28,1* ± 0,007	19,8* ± 0,013	4,7 ± 0,010	28,1* ± 0,003	-

Nota: Valores expressos como média ± DP. (-) Não apresentou atividade. (\*) Resultado estatisticamente significativo em comparação ao controle positivo, considerando  $p < 0,05$ .

Fonte: Dados da pesquisa.

Os resultados comparativos confirmam a capacidade do extrato de *T. cacao* de inibir o crescimento bacteriano para as cepas Gram negativa (*P. aeruginosa*) e Gram positiva (MRSA) (Tabela 2). No entanto, a resposta de inibição demonstra ser mais relevante em relação ao efeito dose-dependente para *P. aeruginosa*, com a concentração de 1000 µg/ml do extrato inibindo 76,2% do crescimento bacteriano e apresentando uma concentração inibitória IC<sub>50</sub> 529 µg/ml. Para MRSA, embora tenha sido observada uma variação da inibição do crescimento bacteriano não dose-dependente abaixo de 1000 µg/ml, essa variação não foi significativa. Já a inibição apenas em altas concentrações para *Staphylococcus aureus* já foi reportada anteriormente (RAJAPAKSHA *et al.*, 2025).

A atividade antibacteriana encontrada neste estudo, apesar de ainda não explorada para a var. Nacional mod., está associada à presença de metabólitos secundários presentes no extrato das folhas de *T. cacao*, sendo os responsáveis por este potencial bioativo. Polifenóis, flavonoides, taninos e alcaloides têm sido citados na literatura como antimicrobianos, tanto para cepas Gram positivas quanto Gram negativas. No estudo de Al-Shalah *et al.* (2023), o extrato aquoso dessa espécie foi eficiente contra várias bactérias (*Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Streptococcus pyogenes*). Kayaputri *et al.* (2019) apresentaram o efeito inibitório sobre *Escherichia coli*, *S. aureus* e *Salmonella sp.* do extrato etanólico da casca do cacau. Santos *et al.* (2014) relataram a suscetibilidade de *P. aeruginosa* ao extrato da casca do fruto. Lawal *et al.* (2014) verificaram a atividade antimicrobiana de taninos, alcaloides e antraquinonas extraídos do *T. cacao*.

Em relação à atividade antibiofilme, não foi observada inibição da formação do biofilme de MRSA, embora tenha sido verificado uma inibição do crescimento de mais de 50% desta cepa na concentração de 1000 µg/ml, com IC<sub>50</sub> 929 µg/ml. A diferença entre a atividade frente à bactéria planctônica e ao biofilme reforça a complexidade fisiológica das comunidades sésseis (SMITH, 2005).

Quanto à formação do biofilme de *P. aeruginosa*, foi observada redução estatisticamente significativa nas concentrações de 1 µg/ml e 1000 µg/ml quando comparado com o controle, porém a supressão total do biofilme não foi alcançada. Embora a inibição tenha sido discreta, o resultado demonstra que o extrato de *T. cacao* apresenta possível efeito na desestabilização da matriz de EPS (Substâncias Poliméricas Extracelulares). Para tanto, os fitoquímicos presentes podem atuar por múltiplos mecanismos, limitando o acesso da bactéria aos nutrientes importantes no processo de adesão

e crescimento ou inibindo o *Quorum Sensing* (QS) (MISHRA *et al.*, 2020). Paczkowski *et al.* (2017), por exemplo, verificaram que os flavonoides apresentam a capacidade de impedir a formação do biofilme de *P. aeruginosa*, por meio do mecanismo de inibição do receptor LasR do QS.

De maneira geral, a ausência de atividade ou baixa eficácia do extrato de *T. cacao* frente às bactérias testadas pode estar relacionada à menor suscetibilidade dos microrganismos aos metabólitos presentes no extrato, possivelmente devido à estrutura desses organismos (CHOI; LEE, 2019). A interação entre os múltiplos metabólitos secundários, podem proporcionar efeito antagônico pela neutralização dos compostos presentes, especialmente quando em concentrações mais altas de extrato. Cruz *et al.* (2022) verificaram que o extrato bruto utilizado em seu estudo possuía uma mistura de vários compostos, o que os levou a considerar que os bioativos poderiam ter sofrido inibição. Além do mais, Das *et al.* (2017) apontam que, em concentrações mais altas de extrato, as moléculas de metabólitos secundários podem formar agregados, reduzindo a difusão desses compostos pela matriz do biofilme e, conseqüentemente, a atividade antibiofilme.

Outro fator a ser considerado na interpretação destes resultados é a seletividade do solvente extrator utilizado. Embora Alam *et al.* (2020) relatem que os extratos acetônicos podem ser menos eficientes na extração dos compostos ativos quando comparados aos alcoólicos, os resultados encontrados indicam que a acetona como solvente influenciou o perfil fitoquímico e, conseqüentemente, a atividade antibacteriana observada, reforçando a importância de investigar diferentes solventes na prospecção de extratos vegetais, tendo em vista que o perfil fitoquímica influencia na atividade biológica.

## 4 CONCLUSÃO

Os resultados aqui demonstrados indicam que o extrato acetônico das folhas de *Theobroma cacao* L., variedade Nacional moderna, apresentou alguns metabólitos secundários relevantes, e atividade antibacteriana e antibiofilme frente a cepas patogênicas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA). A atividade antibiofilme observada para *P. aeruginosa* foi moderada, com os valores de inibição variando entre 19,8% e 28,1%, enquanto que para MRSA não foi observada inibição da formação do biofilme de MRSA, embora tenha sido verificado uma inibição do crescimento de mais de 50% desta cepa. Esses resultados indicam que a utilização da acetona como solvente extrator permitiu a obtenção de um perfil fitoquímico capaz de conferir ação antimicrobiana significativa. Esses achados reforçam o potencial biotecnológico de *T. cacao* e destacam a importância de novas investigações com frações do extrato da folha para melhor avaliação da prospecção de bioativos antibiofilme.

## REFERÊNCIAS

AL-SHALAH, L.A.M. *et al.* Antibacterial effect of aqueous extract of *Theobroma cacao* against gram-negative and gram-positive bacteria: an in vitro study. **J Med Chem Sci**, v. 6, n. 3, p. 464-471, 2023.

ALAM, K. *et al.* Anti-biofilm activity of plant derived extracts against infectious pathogen-*Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **J Infect Public Heal**, v. 13, n. 11, p. 1734-1741, 2020.

ALMEIDA, C.J. *et al.* Controle do biofilme em reservatórios e tubulações de água potável. **Atas Saúde Amb**, v. 7, p. 1-15, 2019.

AMÂNCIO, F.L.R. *et al.* Fenótipos de resistência antimicrobiana epidemiologicamente importantes em culturas de vigilância de um serviço terciário de saúde em Aracaju-SE. **Vigil Sanit Debate**, v. 9, n. 2, p. 111-116, 2021

BORGES, L.P.; AMORIM, V.A. Metabólitos secundários de plantas. **Rev Agrotecnol**, v. 11, n. 1, p. 54-67, 2020.

BFG - Brazil Flora Group. Brazilian Flora 2020: Leveraging the power of a collaborative scientific network. **Taxon**, v. 71, n. 1, p. 178-198, 2022.

CANGUI-PANCHI, S. P. *et al.* Biofilm-forming microorganisms causing hospital-acquired infections from intravenous catheter: A systematic review. **Curr Res Microb Sci**, v. 3, p. 100175, 2022.

CHEN, H. *et al.* Exploring the role of *Staphylococcus aureus* in inflammatory diseases. **Toxins**, v. 14, n. 7, p. 464, 2022.

CHOI, U.; LEE, C.R. Antimicrobial agents that inhibit the outer membrane assembly machines of gram-negative bacteria. **J Microbiol Biotechnol**, v. 29, n. 1, p. 1-10, 2019.

CLSI - Clinical & Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI document M100-S22**. Wayne, PA: CLSI; 2012.

COLLI-SILVA, M. *et al.* **Theobroma in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB23618>. Acesso em: 06 set. 2025.

CRAFT, K. M. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. **Med Chem Comm**, v. 10, n. 8, p. 1231-1241, 2019.

- CRUZ, J.E.R.D. *et al.* Phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activity of extract from leaves and bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. **Rev Ciên Agron**, v. 53, p. e20217903, 2022.
- DAS, A. *et al.* Antibiofilm activity of *Parkia javanica* against *Pseudomonas aeruginosa*: a study with fruit extract. **RSC advances**, v. 7, n. 9, p. 5497-5513, 2017.
- FAJARDO, J.G.B. *et al.* Antioxidant activity, total polyphenol content and methylxantine ratio in four materials of *Theobroma cacao* L. from Tolima, Colombia. **Heliyon**, v. 8, n. 5, e09402, 2022.
- FILOCHE, S.K. *et al.* Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. **Oral Microbiol Immunol**, v. 20, n. 4, p. 221-225, 2005.
- FOUET, O. *et al.* Collection of native *Theobroma cacao* L. accessions from the Ecuadorian Amazon highlights a hotspot of cocoa diversity. **Plants People Planet**, v. 4, n. 6, p. 605-617, 2022.
- GALUTTI, P.G.F. *et al.* Adesão bacteriana em polímeros plásticos. **Unisanta BioScience**, v. 12, n. 2, p. 92-96, 2023.
- GALVÃO, E.L. *et al.* Cacau (*Theobroma cacao*): Uma visão geral de pesquisas atuais sobre os aspectos botânicos, fitoquímicos e farmacológicos. **Res Soc Develop**, v. 13, n. 5, p. e8113545810-e8113545810, 2024.
- HALIM, A. *et al.* Potentiality of incorporating cocoa liquor in skin care cosmetics. **PalArch's J. Archaeol. Egypt/Egyptol**, v. 17, p. 1039-1046, 2020.
- HALL-STOODLEY, L. *et al.* Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n. 2, p. 95-108, 2004.
- JEAN-MARIE, E. *et al.* *Theobroma cacao* and *Theobroma grandiflorum*: botany, composition and pharmacological activities of pods and seeds. **Foods**, v. 11, n. 24, p. 3966, 2022.
- KAYAPUTRI, I.L. *et al.* The antimicrobial effectiveness of cacao shell and cacao husk combination on inhibition of pathogenic bacteria in food products. **IOP Conf Ser Earth Environ Sci**. v. 443, p. 012077, 2019
- LAWAL, T.O. *et al.* Susceptibility testing and bactericidal activities of *Theobroma cacao* Linn. (cocoa) on *Helicobacter pylori* in an in vitro study. **J Herb Med**, v. 4, n. 4, p. 201-207, 2014.

LLERENA, W. *et al.* Profile of bioactive components of cocoa (*Theobroma cacao* L.) by-products from Ecuador and evaluation of their antioxidant activity. **Foods**, v. 12, n. 13, p. e2583, 2023.

MAHESHWARAN, L. *et al.* Phytochemical testing methodologies and principles for preliminary screening/qualitative testing. **Asian Plant Res J**, v. 12, n. 5, p. 11-38, 2024.

MEHMOOD, A. *et al.* In vitro total phenolics, total flavonoids, antioxidant and antibacterial activities of selected medicinal plants using different solvent systems. **BMC Chem**, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2022.

MISHRA, R. *et al.* Natural anti-biofilm agents: strategies to control biofilm-forming pathogens. **Front Microbiol**, v. 11, p. 1-23, 2020.

NASCIMENTO, A.B.T. *et al.* Perfil químico, atividade antibacteriana e combinada do extrato etanólico da folha e casca de *Cedrela fissilis* Vell. (Cedro). **Rev Ensaios Cien**, v. 26, n. 4, p. 465-469, 2022.

OLIVEIRA, G.T. *et al.* Phytochemical characterisation and bioprospection for antibacterial and antioxidant activities of *Lippia alba* Brown ex Britton & Wilson (Verbenaceae). **Nat Prod Res**, v. 32, n. 6, p. 723-731, 2018.

PACZKOWSKI, J.E. *et al.* Flavonoids suppress *Pseudomonas aeruginosa* virulence through allosteric inhibition of quorum-sensing receptors. **J Biol Chem**, v. 292, n. 10, p. 4064-4076, 2017.

PARBUNTARI, H. *et al.* Preliminary phytochemical screening (qualitative analysis) of cacao leaves (*Theobroma cacao* L.). **EKSAKTA**, v. 19, n. 2, p. 40-45, 2018.

PERICOLINI, E. *et al.* Real-time monitoring of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on endotracheal tubes in vitro. **BMC Microbiol**, v. 18, n. 1, p. 84, 2018.

QUN, T. *et al.* Antibacterial activities of anthraquinones: structure-activity relationships and action mechanisms. **RSC Med Chem**, v. 14, n. 8, p. 1446-1471, 2023.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2021. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 21 ago. 2025.

RAAMAN, N. **Phytochemical Techniques**. New Delhi, New India Publishing, 2006.

RAHAYU, Y.C. *et al.* Analysis of antioxidant and antibacterial activity of cocoa pod husk extract (*Theobroma cacao* L.). **Dent J**, v. 56, n. 4, p. 220-225, 2023.

- RAJAPAKSHA, G.D.S.P. *et al.* Effect of growing environment on the quality and quantity of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty Yield. **Trop Agr Res**, v. 36, n. 2, p. 117-131, 2025
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 8a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.
- SCHLÄGER, S.; DRÄGER, B. Exploiting plant alkaloids. **Curr Opin Biotechnol**, v. 37, p. 155-164, 2016.
- SHAMIM, A. *et al.* Natural medicine a promising candidate in combating microbial biofilm. **Antibiotics**, v. 12, n. 2, p. 299-325, 2023.
- SILVA, N.L.A. *et al.* Triagem fitoquímica de plantas de cerrado, da área de proteção ambiental municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, v. 6, n. 2, p. 1-17, 2010.
- SITAREK, P. *et al.* Exploring the therapeutic potential of *Theobroma cacao* L.: insights from in vitro, in vivo, and nanoparticle studies on anti-inflammatory and anticancer effects. **Antioxidants**, v. 13, n. 11, p. 1376-1403, 2024.
- SMITH, A. W. Biofilms and antibiotic therapy: is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems?. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 57, n. 10, p. 1539-1550, 2005.
- SOMAT, H.A. *et al.* Subcritical Water Extraction of Bioactive Compounds from Plant Materials: Recent Advances. **J Future Foods**, v.6, p.753-764, 2025.
- SANTOS, R. X. *et al.* Antimicrobial activity of fermented *Theobroma cacao* pod husk extract. **Genet Mol Res**, v. 13, n. 3, p. 7725-7735, 2014.
- TONG, Z. *et al.* Biological function of plant tannin and its application in animal health. **Front Vet Sci**, v. 8, p. 803657, 2022.
- TRENTIN, D. *et al.* Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **J Ethnopharmacol**, v. 137, n. 1, p. 327-335, 2011. DOI: 10.1016/j.jep.2011.05.030
- TRENTIN, D.S. *et al.* Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Rev Liberato**, v. 14, n. 22, p. 213-236, 2013. DOI: 10.31514/rliberato.2013v14n22.p213
- VALLI, M. *et al.* The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **An Acad Bras Cienc**, v. 90, n. 1 Suppl 1, p. 763-778, 2018.

VIANA, A.R. *et al.* Phytochemical characterization and toxicological activity attributed to the acetonc extract of South American *Vassobia breviflora*. **J Environ Sci Health A**, v. 86, n. 21, p. 816-832, 2023.

WANG, C. *et al.* Evaluation of the antimicrobial function of Ginkgo biloba exocarp extract against clinical bacteria and its effect on *Staphylococcus haemolyticus* by disrupting biofilms. **J Ethnopharmacol**, v. 298, p. 115602, 2022.

WU, L.; LUO, Y. Bacterial quorum-sensing systems and their role in intestinal bacteria-host crosstalk. **Front Microbiol**, v. 12, p. 611413, 2021.

YAHYA, M. *et al.* Anticancer and antiretroviral activities of methanolic extract from *Theobroma cacao* L. pod husk: Focusing on the ethyl acetate partition. **F1000Res**, v. 11, p. 1395, 2022.

ZHANG, K. *et al.* Promising therapeutic strategies against microbial biofilm challenges. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 10, p. 359, 2020.

---

Recebido em: 13 de Outubro de 2025

Avaliado em: 23 de Março de 2026

Aceito em: 2 de Abril de 2026

---



**A autenticidade desse artigo  
pode ser conferida no site  
<https://periodicos.set.edu.br>**

---

Copyright (c) 2026 Revista Interfaces  
Científicas - Saúde e Ambiente



Este trabalho está licenciado sob uma  
licença Creative Commons Attribution-  
NonCommercial 4.0 International License.

---

1 Graduanda em Ciências Biológicas. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, Vitória da Conquista, BA. Brasil. ORCID: 0009-0002-4587-4150. Email: yasminsants00@gmail.com

2 Bióloga. Doutora em Desenvolvimento e Meio Ambiente. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, Vitória da Conquista, BA. Brasil. ORCID: 0000-0003-1080-2368. Email: francine.souza@uesb.edu.br

3 Biólogo. Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC, Ilhéus, BA. Brasil. Email: biomaicongama@gmail.com

4 Bióloga. Doutora em Genética e Biologia Molecular. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, Vitória da Conquista, BA. Brasil. ORCID: 0000-0002-4046-442X. Email: regineide.xavier@uesb.edu.br

