

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

ORTENCIA CASSIANO VIEIRA

**PERFIL FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO DECOCTO
DE *Medusantha martiusii* (Benth) (Lamiaceae) FRENTE À BACTÉRIA
FORMADORA DE BIOFILME DENTÁRIO**

Juazeiro do Norte – CE
2018

ORTENCIA CASSIANO VIEIRA

**PERFIL FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO DECOCTO
DE *Medusantha martiusii* (Benth) (Lamiaceae) FRENTE À BACTÉRIA
FORMADORA DE BIOFILME DENTÁRIO**

Artigo Científico apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Aracelio Viana Colares

ORTENCIA CASSIANO VIEIRA

**PERFIL FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO DECOCTO
DE *Medusantha martiusii* (Benth) (Lamiaceae) FRENTE À BACTÉRIA
FORMADORA DE BIOFILME DENTÁRIO**

Artigo Científico, apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr Aracelio Viana Colares

Data da Aprovação: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Aracelio Viana Colares
Orientador

Prof. Esp. Francisco Yhan Pinto Bezerra
Examinador 1

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho
Examinador 2

PERFIL FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO DECOCTO DE *Medusantha martiusii* (Benth) (Lamiaceae) FRENTE À BACTÉRIA FORMADORA DE BIOFILME DENTÁRIO

ORTENCIA CASSIANO VIEIRA¹, ARACELIO VIANA COLARES².

RESUMO

O objetivo do trabalho é analisar o perfil químico e potencial antibacteriano do decocto da *Medusantha martiusii* (Benth) (Lamiaceae) frente ao *Streptococcus mutants*. A preparação do decocto seguiu o método de Avancini e Wiest (2008), com modificações. A análise do perfil químico foi feita pelo método de HPLC, a Concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada utilizando-se ensaio de microdiluição com concentrações do extrato que variaram de 512 a 1 µg/mL, a modulação do decocto com o antibiótico clorexidina, a determinação da atividade antiaderente *in vitro*, foi realizada a Concentração Inibitória Mínima da Aderência (CIMA), os resultados obtidos com o CIM e modulação foram distribuídos em planilha utilizando software Microsoft Excel®2010 e em gráficos usando o programa GraphPadPrism 7.04. No perfil químico do decocto foram identificados compostos majoritários como ácido cafeico seguido da quercetina. Na MIC não houve inibição do crescimento da bactéria, na modulação foi observado um efeito antagônico sobre o antibiótico clorexidina. Os testes de biofilme não apresentaram inibição do crescimento. Em testes de susceptibilidade microbiana há variáveis que devem ser levadas em conta como da escolha da técnica, material testado e sua concentração, além dos microrganismos. O decocto no presente estudo não apresentou atividade antimicrobiana, contudo um estudo dos componentes minoritários isoladamente poderia contribuir para uma melhor ação biológica do decocto.

Palavras-chaves: antibacteriana, decocto, perfil químico.

ABSTRACT

The objective of this work is to analyze the chemical profile and antibacterial potential of the decoction of *Medusantha martiusii* (Benth) (Lamiaceae) against *Streptococcus mutants*. The decoction preparation followed the method of Avancini and Wiest (2008), with modifications. Minimal inhibitory concentration (MIC) was determined using a microdilution assay with extract concentrations ranging from 512 to 1 µg / mL, determination of *in vitro* non-stick activity was performed the Minimum Inhibitory Adhesion Concentration (CIMA), the results obtained with MIC and modulation were distributed in spreadsheet using Microsoft Excel®2010 software and in graphs using the program GraphPadPrism 7.04. In the chemical profile of the decoction were identified majoritaric compounds such as caffeic acid followed by quercetin. In the MIC there was no inhibition of bacterial growth, in the modulation an antagonistic effect on the antibiotic chlorhexidine was observed. Biofilm tests showed no inhibition of growth. In tests of microbial susceptibility there are variables that must be taken into account as of the choice of technique, material tested and its concentration, besides the microorganisms. The decoction in the present study did not present antimicrobial activity, although a study of the minority components alone could contribute to a better biological action of the decoct.

Keywords: Antimicrobial, decoct, chemical profile.

¹ Discente do Curso de Biomedicina, ortencia.paramore@gmail.com, Centro Universitário UniLeão, Juazeiro do Norte, Ceará.

² Docente do Curso de Biomedicina, aracelio@leaosampaio.edu.br, Centro Universitário UniLeão, Juazeiro do Norte, Ceara.

1. INTRODUÇÃO

Desde de antigamente as plantas medicinais são utilizadas tradicionalmente em combate a doenças, essa ação terapêutica de tais plantas incentiva a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos. O crescente interesse em pesquisas que envolve a avaliação de atividades antimicrobianas de plantas medicinais tem-se aumentado devido a visão dessas espécies como alternativa no tratamento de doenças e pelo aumento de microrganismos resistentes a antibióticos. (AMPARO et al., 2017; DAS; TIWARI; SHRIVASTAVA, 2010).

Uma das principais preocupações atualmente é a resistência microbiana que dificulta o tratamento de doenças aumentando o tempo da mesma junto com a mortalidade e custos. Atualmente tem-se elevado os microrganismos resistentes aos fármacos utilizados e diminuído as descobertas de novos antimicrobianos (JINDAL; PANDYA; KHAN, 2015).

O biofilme é um conjunto de bactérias que se encontram sobre uma superfície inerte ou viva, são heterogêneos em relação a estrutura, composto por microcolônias de bactérias envolvidas por uma matriz de EPS (exopolissacarídeos) e separados de outras microcolônias por canais de água, onde nesses canais ocorre fluxo de líquido facilitando a obtenção de nutrientes e oxigênio. Principais bactérias que formam biofilme são a *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans* (formação de biofilmes em placas dentárias) *Staphylococcus epidermidis* (biofilmes em lente de contato) (DONLAN, 2000; FALSETTA et al., 2014; JAMES et al., 1995; PADUA et al., 2009).

O gênero *Medusantha* apresenta diversas atividades comprovadas, a espécie *Medusantha martiusii* popularmente conhecida como “cidreira do campo” que possui extrato etanólico apresenta como sua principal atividade biológica o efeito antimicrobiano (FIGUEREIDO et al., 2018; OLIVEIRA, 2011).

Apesar da grande necessidade de novos medicamentos, o presente estudo visa acrescentar mais pesquisas a partir de plantas terapêuticas que são utilizadas como método alternativo pela população ao uso de medicamentos comercializados e que muitas vezes se mostram bem eficaz, ressaltando a sua importância na obtenção de novos fármacos.

Com isso o objetivo do presente trabalho é avaliar o perfil químico e o potencial antibacteriano do decocto de *Medusanthia martiusii* (Bentham) (Lamiaceae) frente ao *Streptococcus mutans*.

2. METODOLOGIA

O presente trabalho foi de natureza experimental, com abordagem qualitativa e quantitativa e todos os testes foram realizados nos laboratórios de microbiologia e bioquímica do Centro Universitário Leão Sampaio, no município de Juazeiro do Norte – CE, no período de agosto a setembro de 2018.

MATERIAL VEGETAL E PREPARAÇÃO DO DECOCTO

Folhas de *Medusanthia martiusii* foram coletadas folhas do Sítio Barreiro Grande (07°21'44,0''S e 39°28'41,0''W) localizadas no município de Crato, estado do Ceará, e uma exsiccata foi depositada e identificada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima, da Universidade Regional do Cariri (URCA), sob o número 4610.

A preparação do decocto seguiu o método de Avancini e Wiest (2008), com modificações. Do material vegetal, 390g foram colocados em um Erlenmeyer hermeticamente selado contendo 1 L de água destilada estéril. A decocção foi realizada utilizando calor durante aproximadamente 20 minutos a partir do início da ebulição. Após esse período e o consequente resfriamento à temperatura ambiente, o decocto foi filtrado, transferido para um recipiente estéril e congelado em freezer convencional a -18° C por um período de 24h. O produto foi posteriormente submetido à secagem por liofilização, a uma pressão de vácuo de aproximadamente 130 µHg, com temperatura do condensador de -50° C. Foram obtidos 7,264 g de decocção liofilizada, correspondendo a um rendimento de 1,86%.

QUANTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES POR HPLC-DAD

O decocto de *Medusanthia martiusii* foi injetado na coluna Phenomenex C18 de fase reversa (4,6 mm x 250 mm) com partículas de 5 µm de diâmetro. As fases móveis A e B foram água Milli-Q, acidificadas para pH 2,0 com 1% de ácido fosfórico e metanol, correspondentemente, foi utilizado o gradiente de solvente como se segue: 0-10 min, 5% B; 10-25 min, 15% de B; 25-40 min, 30%; 40-55 min a 50% de B; 50-65 min 70% de B; 65-80 min, 100% B, seguindo o método descrito por Waczuk et al. (2015) com ligeiras modificações. O decocto de *M. martiusii* foi analisado na concentração de 10 mg/mL, a vazão

foi de 0,6 mL/min, o volume de injeção foi de 50 µL. A amostra e a fase móvel foram filtradas através de um filtro de membrana de 0,45 µm (Millipore) e depois foram degaseificadas por banho de ultra-sons antes de serem utilizadas. Soluções estoque de referências de padrões foram preparadas em metanol: água (1:1, v/v) em uma faixa de concentração de 0,030 - 0,500 mg/mL. As quantificações foram realizadas por integração dos picos utilizando o método padrão externo a 270 nm para ácido gálico e ácido elágico; 280 nm para catequina, 325 nm para ácido cafeico e ácido clorogénico; e 366nm para quercetina e rutina. Os picos de cromatografia foram confirmados pela comparação do tempo de retenção com os padrões de referência e pelo espectro DAD (200 a 600 nm). Todas as operações de cromatografia foram realizadas à temperatura ambiente e em triplicata (Boligon et al., 2013).

CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA- CIM

Para a efetuação dos testes primeiramente realizou-se o preparo de uma solução inicial, onde o decocto foi solubilizado em Dimetilsulfóxido a 3%. Em seguida, as soluções foram diluídas em água destilada atingindo concentração de 1024µg/mL, onde foram realizadas diluições seriadas 1:2 durante o teste de microdiluição, obtendo-se as concentrações de extrato variando de 512 a 1µg/mL.

Os meios de cultura utilizados durante as atividades foram, *Brain Heart Infusion* – BHI agar, BHI caldo e BHI sacarosado, todos os meios de cultura foram preparados segundo as especificações do fabricante e esterilizados em autoclave.

Os microrganismos empregados foram cepas bacterianas de *Streptococcus mutans* (ATCC: 00446). As linhagens foram mantidas em BHI Agar. Em seguida suspendidas em tubo de ensaio com salina 0,9% para obter uma suspensão com turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland (1×10^8 UFC/mL).

A Concentração mínima inibitória (CIM) foi determinada utilizando um ensaio de microdiluição. Antes do inóculo bacteriano, foram adicionados 100 uL de caldo BHI e amostras do decocto (100 uL) que foram diluídas em série, dando concentrações finais de 512-1 mg / mL, após isto um inóculo de 10 uL da suspensão bacteriana (10^5 UFC / mL) foi acrescentado nos 96 poços utilizados da placa de microdiluição. A leitura foi feita com adição de rezasurina 20µg em cada poço.

TESTE DE MODULAÇÃO DE DROGAS

A modulação foi realizada com a solução do decocto em adição da clorexidina, onde utilizou-se a CIM do produto dividido por oito, resultando em uma concentração inicial de 64µg/mL. Assim na CIM foram primeiramente distribuídos 100 µL do caldo de BHI e adicionado 100 µL do decocto e também de clorexidina, os quais foram diluídos seriadamente na placa de microdiluição após isso houve a adição de 10 µL da suspensão bacteriana em todos os poços.

CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DA ADERÊNCIA (CIMA)

A determinação da atividade antiaderente *in vitro*, foi realizada a Concentração Inibitória Mínima da Aderência (CIMA) em tubos de ensaio contendo 2,5mL de BHI caldo sacarosado, 0,5mL de inóculo bacteriano, e 0,5mL da solução preparada com o decocto de *Medusanthia martiusii*. Os tubos foram incubados com inclinação de 30°, a uma temperatura de 37°C por 24 horas em estufa. A leitura foi realizada com os tubos da mesma forma que saíram da estufa, com adição de 3 gotas de evidenciador de placa. Esse teste foi realizado em duplicata (FREIRES et al., 2010).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

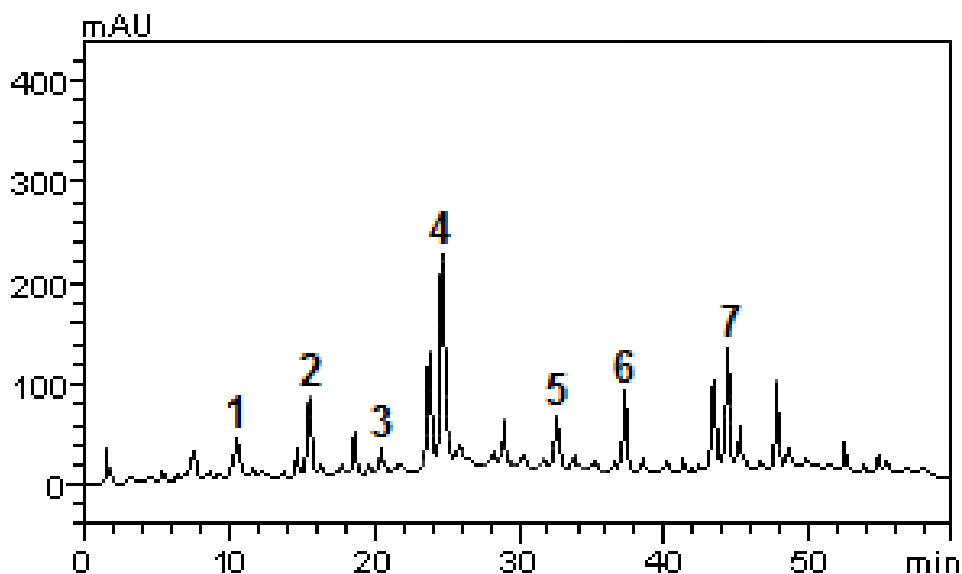
A identificação e quantificação dos constituintes do decocto foram obtidos por HPLC e estão representados na tabela 1 e gráfico 1.

Tabela 1 – Composição do decocto de *Medusanthia martiusii*.

| Compostos | <i>Medusanthia martiusii</i> | | LOD | LOQ |
|------------------|------------------------------|------|-------|-------|
| | mg/g | % | g/mL | g/mL |
| Ácido Gálico | 2.85 ± | 0.28 | 0.015 | 0.049 |
| Catequina | 6.17 ± 0.03 b | 0.61 | 0.009 | 0.031 |
| Ácido clorogênic | 1.09 ± 0.01 c | 0.10 | 0.023 | 0.079 |
| Ácido Caféico | 15.36 ± 0.01 d | 1.53 | 0.018 | 0.057 |
| Ácido Elágico | 2.91 ± 0.02 a | 0.29 | 0.025 | 0.086 |
| Rutina | 6.24 ± 0.03 b | 0.62 | 0.007 | 0.027 |
| Quercetina | 7.85 ± 0.02 e | 0.78 | 0.024 | 0.079 |

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (DP) de três determinações. Médias seguidas por letras diferentes diferem pelo teste de Bonferroni a $p < 0,05$. LOD: Limite de detecção e LOQ: limite de quantificação.

Figura 1 –Análise química (HPLC) do decocto de *Medusantha martiusii*. A utilização da análise padrão e espectral foram identificado os compostos ácido gálico (pico 1), catequina (pico 2). Ácido clorogênico (pico 3), ácido cafeico (pico 4), ácido elágico (pico5), rutina (pico 6) e quercetina (pico 7).



Fonte: Própria

O composto marjoritário da espécie foi o ácido cafeico, seguido dos compostos quercetina e rutina, que são classificados respectivamente como tanino hidrossolúvel e flavonoide. Segundo Becho et al (2009), os flavonoides estão entre as principais substâncias derivadas de vegetais formada por cerca de 4000 compostos entre os quais estão quercetina, rutina, luteonina, kanfeno, genisteina e etc.

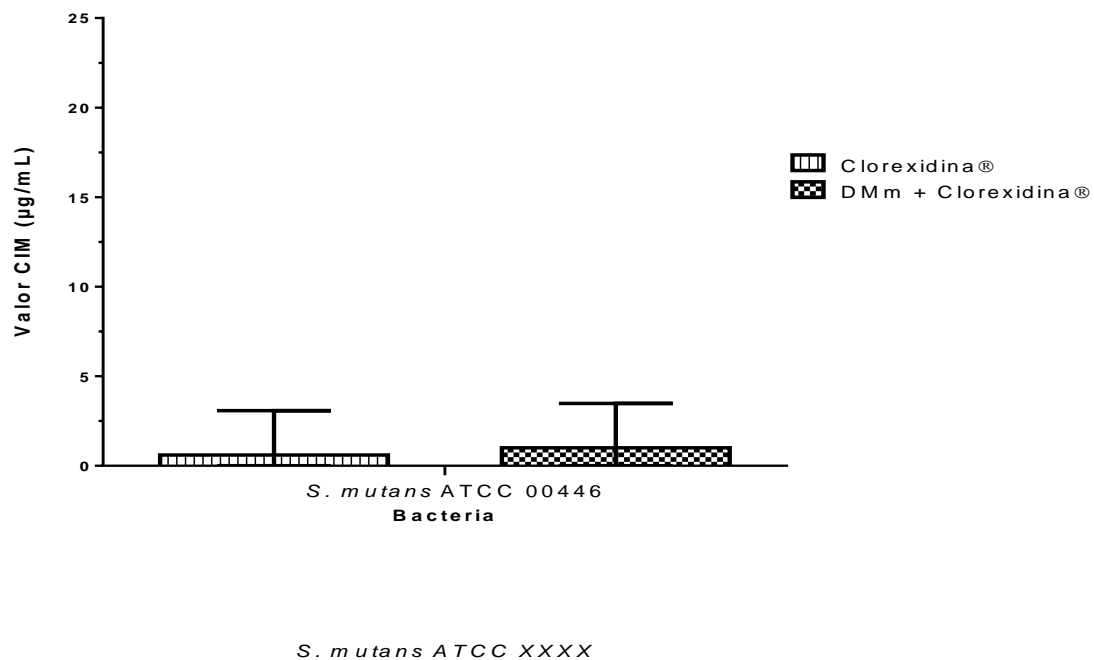
Através de várias técnicas fitoquímicas usando HPLC essas substâncias podem ser obtidas isoladamente. Vários efeitos biológicos são atribuídos aos flavonoides principalmente antiinflamatória (suspendendo a ação das prostaglandinas e leucotrienos) e antioxidante (remoção de radicais livres) além de antibacteriana (por meio da inibição da síntese da enzima de RNA ou atividade sobre estrutura química da parede celular).

No presente estudo a MIC, modulação e testes de antiaderência apresentaram resultados sem significância frente a bactéria *Streptococcus mutants* que é a principal causadora da cárie e biofilme dentário. Na MIC não houve inibição da bactéria resultado expresso na tabela 2. Na modulação com a clorexidina houve um resultado não significativo, indiferente do efeito modulador expresso no gráfico 3.

Tabela 2: Concentração inibitória mínima (CIM) do decocto de *Medusantha martiusii* frente a cepa de *Streptococcus mutans* formadora de biofilme dentário. DMm: Decocto de *Medusantha martiusii*

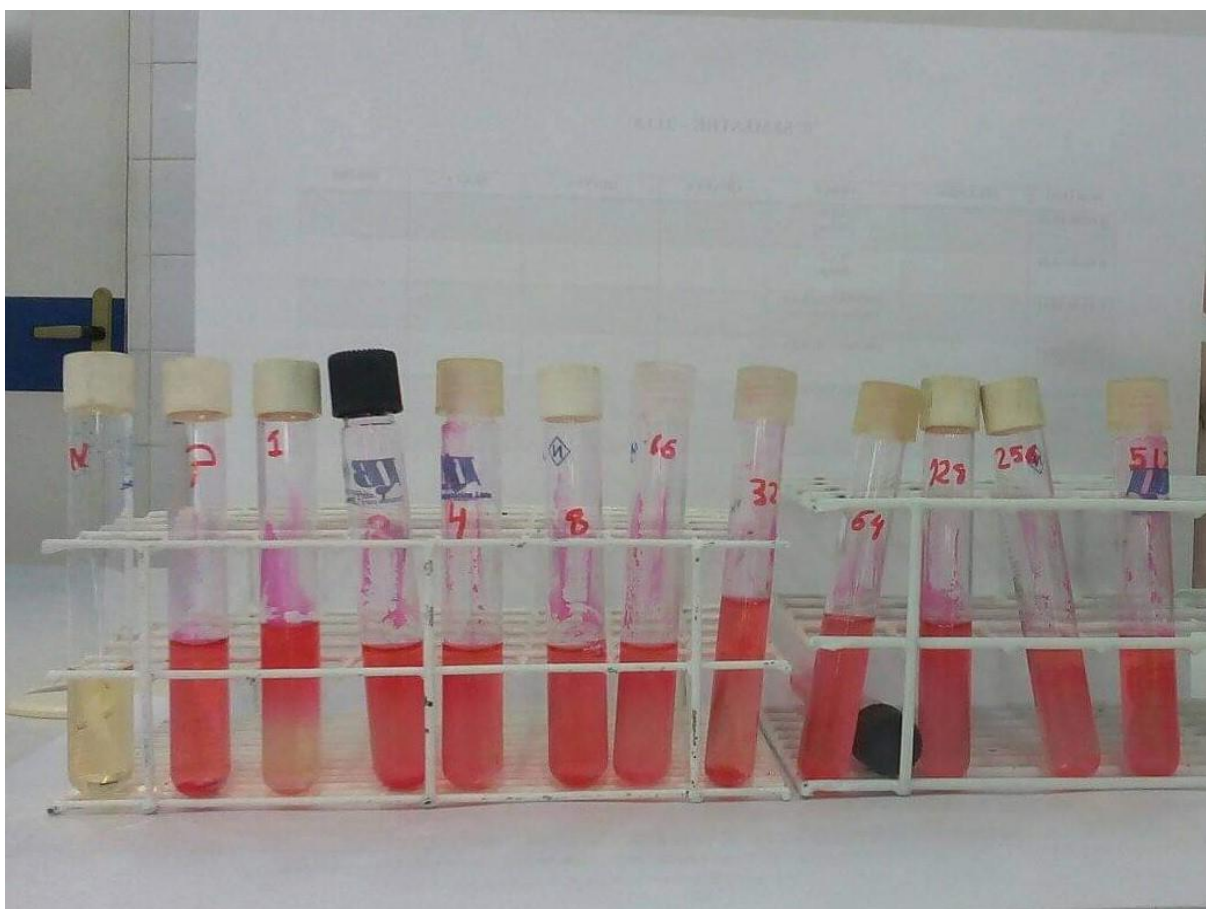
| Composto | CIM ($\mu\text{g/mL}$) |
|--------------|-----------------------------|
| | <i>S. mutans</i> ATCC 00446 |
| DMm | $>512 \pm 0.088$ |
| Clorexidina® | $0,23 \pm 0.047$ |

Figura 3. Atividade moduladora do decocto de *Medusantha martiusii* (DMm) com clorexidina®, frente a cepa de bactérias formadora de biofilme dentário



No testes de antiaderência não foi observado a inibição do crescimento sobre o biofilme pois houve o crescimento da bactéria em todas as concentrações, como elucidado na Imagem 1.

Figura 1: Atividade antiaderente do decocto frente ao *Streptococcus mutants*



FONTE: PRÓPRIA

O decocto da *Medusantha martiusii* possui constituintes biológicos de suma importância segundo Menezes (2005) o ácido cafeico e quercetina são substâncias com grande atividade antiinflamatória, resultante da inibição das prostaglandinas e leucotrienos pelos macrófagos. Além de estudos que comprovam o potente efeito antioxidante da rutina.

Os compostos minoritários ácido clorogênico, ácido galico e ácido elágico são considerados taninos hidrossolúveis, esses compostos possuem uma ação antimicrobiana comprovada e agem de maneira inespecífica sobre os microrganismos rompendo a parede celular e inibindo processos enzimáticos para sua formação (JESUS et al., 2010).

Alguns estudos comprovaram a ação antibacteriana da *Medusantha martiusii* através da utilização do seu extrato etanólico. Coutinho (2008) comprovou essa atividade frente as cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina além de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Já Oliveira (2011) observou na atividade moduladora do extrato etanólico da *Medusantha martiusii* com amicacina e neomicina um efeito anagônico frente a *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Contudo no presente estudo o decocto da espécie não apresentou tais efeitos antimicrobiano. Em testes de susceptibilidade microbiana a variáveis que devem ser levadas em consideração como a escolha da técnica, os meios de cultura, microrganismos e o próprio material testado. Segundo Nascimento et al. (2007) para visar uma melhora na qualidade dos procedimentos, tornou-se comum o uso de agentes emulsificadores como por exemplo o DMSO (dimetil sulfoxido), eles permitem uma melhor visão da atividade antimicrobiana dos óleos, contudo a utilização do mesmo pode acarretar algumas interações com o teste.

Os emulsificadores podem agir antagonicamente ou sinergicamente aos compostos ativos do material testado. Outros fatores que influenciam nos valores da CIM pode ser condições de cultivo (tempo de incubação, temperatura, taxa de oxigênio), meio de cultura e a concentração da substância testada (RIOS; RECIO, 2005).

Neto e Lopes (2007) destacam as particularidades dos compostos testados, fatores como clima, solo, época, forma de plantio até padrões de variações geográficas como latitude, longitude e altitude, afetam a composição química e a disponibilidade dos metabolitos secundários elevando ou diminuindo os mesmos e provocando alterações na atividade antimicrobiana.

4 CONCLUSÃO

No decocto da *Medusantha martiusii* foi constatado a presença de compostos majoritários como ácido cafeico e quercetina, não apresentando atividade antibacteriana significativa, contudo um estudo dos componentes minoritários isoladamente poderia contribuir para uma melhor ação biológica do decocto.

REFERÊNCIAS

AMPARO, T. R., BRAGA, V. C. C., SEIBERT, J. B., SOUZA, G. H. B., TEIXEIRA, L. F. M. Métodos para avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de plantas medicinais: a necessidade da padronização. **Infarma ciências farmacêuticas**. v. 30, n. 1, 2018.

AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M. Atividade desinfetante do decocto de *Hypericum caprifoliatum* Cham. e Schlecht. – Guttiferae (“escadinha/sinapismo”), frente a diferentes doses de *Staphylococcus aureus* (agente infeccioso em mastite bovina). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.10, n. 1, 2008.

BECHO, J. R. M., MACHADO, H., GUERRA, M. O. Rutina- Estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. **Revista Institucional de Estudos Experimentais**. v. 1, n.1, 2009.

BOLIGON A. A., KUBIC T. F., MARIO D. N. “Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts,” **Acta Physiologiae Plantarum**. vol. 35, n. 7, 2013.

COUTINHO, H. D. M. et al. *In vitro* anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. supl, 2008.

DAS, K., TIWARI, R. K. S. E., SHRIVASTAVA, D. K. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. **Journal Medicinal Plants Research**. v. 4, n.2, 2010.

DONLAN, R. M., Role of biofilms in antimicrobial resistance. **ASAIO journal**. v. 46, n. 6, 2000.

FALSETTA, M. L. et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. **Infection and immunity**. v. 82, n. 5, 2014.

FIGUEREIDO, F. R. D. N. et al. Avaliação da atividade moduladora e citotóxica do óleo essencial das folhas de *Hyptis martiusii* Benth. **Revista Ciencias de la salud**. v. 16, n. 1, 2018.

FREIRES, I. de A., et al. Atividade antibacteriana e antiaderente in vitro de tinturas de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) e *Solidago microglossa* (Arnica) frente a bactérias formadoras de biofilme dentário. **Odontologia Clinico-Científica (Online)**. v. 9, n. 2, 2010.

JAMES, G. A.; BEAUDETTE, L.; COSTERTON, J. W. Interspecies bacterial interactions in biofilms. **Journal of Industrial Microbiology**. v. 15, n. 4, 1995.

JESUS, R. P. F. S. et al. Ação antimicrobiana e antiaderente de *Pithecellobium Cochliocarpum* (gomez) macbr sobre microrganismos orais. **Odontologia Clinica-Cientifica**. v. 9, n. 4, 2010.

JINDAL, A. K., PANDYA, K., KHAN, I. D., Antimicrobial resistance: A public health challenge. **Medicinal Journal Armed Forces India**. v. 71, n.2, 2015.

OLIVEIRA, A. D. L. **Estudo químico e avaliação biológica do óleo essencial**

de *Hyptis martiusii* Benth.(Lamiaceae). 2011. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção molecular) Universidade Regional do Cariri, Crato, 2011.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do instituto biológico**. v. 72, n. 3, 2005.

NASCIMENTO, P. F. C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, n. 1, 2007.

NETO, L. G., LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. v. 30, n. 2, 2007.

PÁDUA, M. et al. Biofilme em rinossinusite crônica com polipose nasossinusal: estudo piloto **.Brazilian journal of otorhinolaryngology**. v. 75, n. 6, 2009.

RÍOS, J. L., RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacol**. v. 100, 2005.