

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

BRUNO STEVENSON MOREIRA BESERRA

**BIOATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA DO EXTRATO HIDRO
ALCOÓLICO DE *Mentha Piperita* FRENTE AS CEPAS ISOLADAS DE *Escherichia
coli* E *Staphylococcus aureus*.**

Juazeiro do Norte, Ceará

2018

BRUNO STEVENSON MOREIRA BESERRA

**BIOATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA DO EXTRATO HIDRO
ALCOÓLICO DE *Mentha Piperita* FRENTE AS CEPAS ISOLADAS DE *Escherichia
coli* E *Staphylococcus aureus*.**

Trabalho de Conclusão de Curso – *Artigo Científico*, apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

Orientador: Ma. Tassia Thaís Al Yafawi

Co-orientador: Dra. Thially Braga Gonçalves

Juazeiro do Norte, Ceará

2018

BRUNO STEVENSON MOREIRA BESERRA

**BIOATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA DO EXTRATO HIDRO
ALCOÓLICO DE *Mentha Piperita* FRENTE AS CEPAS ISOLADAS DE *Escherichia
coli* E *Staphylococcus aureus*.**

Trabalho de Conclusão de Curso – *Artigo Científico*, apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

Orientador: Ma. Tassia Thaís Al Yafawi
Co-orientador: Dra. Thially Braga Gonçalves

Data da aprovação: 06 / 12 / 18

BANCA EXAMINADORA

Tassia Thaís Al Yafawi

Professor (a) Ma. Tassia Thaís Al Yafawi

Orientador

Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro

Professor (a) Ma. Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro

Examinador 1

Rakel Olinda Macedo da Silva

Professor (a) Esp. Rakel Olinda Macedo da Silva

Examinador 2

Juazeiro do Norte, Ceará

2018

BIOATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA DO EXTRATO HIDRO ALCOÓLICO DE *Mentha Piperita* FRENTE AS CEPAS ISOLADAS DE *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus*.

Bruno Stevenson Moreira Beserra¹; Thially Braga Conçalves²; Tassia Thais Al Yafawi³.

RESUMO

O objetivo da pesquisa foi avaliar o efeito antibacteriano e modulador *in vitro* do extrato hidro alcóolico da planta medicinal *Mentha piperita* utilizado frente a cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A obtenção do extrato hidro alcóolico de *Mentha piperita* ocorreu através da metodologia de hidro destilação, a partir das folhas da planta. O extrato foi testado frente as cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* padrões e multirresistentes utilizando-se as metodologias de Microdiluição e Modulação da resistência aos antibióticos. A pesquisa em questão teve como intuito contribuir para o aprimoramento de substâncias naturais ou fitoterápicas que possuam alguma ação antimicrobiana, auxiliando no tratamento de infecções causadas por microrganismos. O extrato testado mostrou modulação em medicamentos como os aminoclicosídeos, demonstrando sinergismo com os fármacos em cepas de *Staphylococcus aureus* e antagonismo em cepas de *Escherichia coli*.

Palavras-chaves: Ação antimicrobiana, Extrato vegetal, *Mentha Piperita*, Sensibilidade.

ANTIBACTERIAN AND MODULATED BIOACTIVITY OF ALCOHOLIC HYDRO EXTRACT OF *Metha Piperita* IN ISOLATED *Escherichia coli* AND *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

The objective of the research was to evaluate the antimicrobial and in vitro modulator effect of the hydro alcohol extract of the medicinal plant *Mentha piperita* used against strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The extraction of the hydro alcohol extract of *Mentha piperita* occurred through the hydro distillation methodology, from the leaves of the plant. The extract was tested against strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* using Microdilution and Modulation methodologies of antibiotic resistance. The aim of the research was to contribute to the improvement of natural or phytotherapeutic substances that have some antimicrobial action, helping to treat infections caused by microorganisms. The extract tested showed modulation in drugs such as aminocluodides, demonstrating synergism with drugs in strains of *Staphylococcus aureus* and antagonism in strains of *Escherichia coli*.

Key words: Antimicrobial action, *Mentha Piperita*, Plant Extrates, Sensitivity.

¹Graduando do curso de Biomedicina, brunosteverson@gmail.com, Centro Universitário Leão Sampaio

²Co-orientador (a) do Artigo Científico, thially@gmail.com, Centro Universitário Leão Sampaio

³Oientador (a) do Artigo Científico, tassiathaisalencar@gmail.com, Centro Universitário Leão Sampaio

1. INTRODUÇÃO

Nas cavidades do corpo humano habitam uma infinidade de microrganismos formando uma imensa hierarquia estrutural como um ecossistema, podendo estar aderidos à superfície das mucosas, contribuindo para formação de biofilmes (DAMACENO; FARIAS, 2016; ZAGO et al., 2009).

Presente em mucosas tanto do trato gastrointestinal, como também no trato urinário, no qual pode ser tornar patogênico quando presente, o microrganismo *Escherichia coli* é responsável por relevante parte das infecções intestinais bacterianas, devido a produção de toxinas distintas de acordo com seu sorotipo, podendo desencadear respostas inflamatórias em outros sistemas do organismo, causando inclusive quadros de sepse em pacientes hospitalizados (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Outro grupo de microrganismos comuns em infecções, o gênero *Staphylococcus sp*, em particular à espécie *Staphylococcus aureus*, é reconhecida por ser uma das principais bactérias responsáveis por uma ampla prevalência de infecções, desde as mais simples infecções de pele culminando até em bacteremias, interligada com alto índice de mortalidade junto com o uso desenfreado dos antibióticos, e septicemias, na maioria das vezes sendo fatais. Como também podem surgir em quadros de endocardites de prótese de válvula cardíaca (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; ZAGO et al., 2009).

Várias plantas, como *Mentha piperita* ou Hortelã pimenta, são amplamente utilizadas pelas populações antigas, por se tratar de um vegetal que possui atividades biológicas no organismo humano, atuando com propriedades antiinflamatória, anti-histamínica e até adstringente; causando afeito em vários microrganismos, ajudando no combate a infecções tanto por bactérias, como também por fungos, por isso a utilização de plantas medicinais na terapêutica e na restauração da saúde vem se lapidando ao longo dos tempos (ANIBAL et al., 2014; PEREIRA et al., 2010; SCAVRONI; et al., 2006).

Desse modo, a pesquisa e avaliação de extratos de plantas medicinais vêm tomando relevância devido à quantidade crescente de cepas de microrganismos com mecanismos de resistência adquiridos frente aos medicamentos já fabricados e utilizados no tratamento. Por isso, a coleta de novas substâncias e compostos desses vegetais, de interesse medicinal devido a sua utilização popular durante anos, permite a avaliação de algum possível efeito substancial na estrutura dos microrganismos ao ponto de promover a lise dos mesmos, ao mesmo tempo, analisando as possíveis falhas e efeito indesejado dos excrementos em utilização (SOUSA; et al., 2011).

Por tanto, o objetivo da pesquisa foi avaliar o efeito antimicrobiano e modificador *in vitro* do extrato hidro alcoólico da planta medicinal *Mentha piperita* frente a cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.2 Tipo e Local de Estudo

O tipo de estudo ao qual esse artigo se engloba tratou-se de um estudo experimental de caráter quantitativo. O local de estudo onde ocorreu à análise e desenvolvimento do artigo científico, por um período de dois meses, de setembro a outubro de 2018, foi no laboratório de Microbiologia do Campus Saúde, localizado no Centro Universitário Doutor Leão Sampaio, no município de Juazeiro do Norte.

2.1.3 Planta e material isolado utilizada

A planta medicinal identificada como *Mentha Piperita* foi coletada no período matutino, sem chuvas, no município de Juazeiro do Norte, no estado do Ceará, Brasil (Latitude: -7.2337878; Longitude: -39.3206521; Elevação: 436 m); logo uma exsicata foi depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade, na Universidade Estadual do Cariri, localizado no município de Crato, Ceará.

2.1.4 Cepas isoladas

As cepas utilizadas nos testes de atividade antimicrobiana foram cepas de *Escherichia coli* ATCC (25922) e *Staphylococcus aureus* ATCC (25923), todas devidamente registradas e produzidas pela LaborClin®, como também foram utilizadas cepas multirresistentes de *Escherichia coli* 27 e *Staphylococcus aureus* 328.

2.1.4 Antibióticos e Meios de Cultura

O meio de cultura utilizados foi o *Brain Heart Infusion* (BHI). Os antibióticos utilizados respectivamente foram gentamicina (classe dos aminoglicosídeos) e clindamicina (classe das lincosamidas).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Extração do extrato hidro alcoólico

A extração do extrato hidro alcoólico da planta medicinal *Mentha piperita* ocorreu pela metodologia de Krychak-Furtado (2006), que realizou a extração de substâncias da solução feita a partir das folhas maceradas da planta, aumentando a superfície de contato, embebido em água destilada e estufado dentro de balões volumétricos por um período 48 horas, sendo filtrado e aquecido a temperaturas medianas objetivando conseguir extrair os componentes mais instáveis e voláteis da superfície de contato da planta por evaporação, podendo variar entre 40 e 50 graus célsius.

2.2.2 Inoculação das cepas isoladas

O preparo dos inóculos para os testes de suscetibilidade foram feitos utilizando meios de crescimento microbiológico como BHI ou *Brain Heart Infusion*, seguindo as recomendações do protocolo adequadas ao manual da Agência de Vigilância Sanitária e o Clinical & Laboratory Standards Institute (ANVISA, 2000; FRED; ROBERT, 2007).

Foram realizadas culturas de 24 horas em água BHI, preparadas e inoculadas em água destilada estéril, 5 ml, comparando-se a turbidez com a escala de Mc Farland 0,5 para em seguida, realizar o semeio em placas de microdiluição (ANVISA, 2003).

2.2.3 Teste de atividade antimicrobiana por microdiluição

Este método foi realizado de acordo com a CLSI (2005) e CLSI (2013). Pequenos volumes de meio e de soluções foram preparados a partir dos extratos e distribuídas em cavidades de microplacas estéreis. A solução de teste foi preparada em concentração dobrada (1024 µg/mL) em relação à concentração inicial definida em volumes de 100 µL, onde foram diluídas seriadamente 1:2 em caldo BHI 10%. Em cada cavidade com 100 µL do meio de

cultura contendo amostra de suspensão microbiana diluída na proporção 1:10. As placas preenchidas foram incubadas a 35°C por 24 horas.

Para evidenciar a CIM da solução frente as linhagens bacterianas, foi preparada uma solução indicadora de resazurina sódica (Sigma) em água destilada estéril na concentração de 0,01% (p/v). Após a incubação, 20 µL da solução indicadora, foram adicionados em cada cavidade e as placas passarão por um período de incubação de 1 hora em temperatura ambiente. A mudança de coloração azul para rosa ocorreu devido à redução da Resazurina, no qual indica o crescimento bacteriano, auxiliando a visualização da CIM, definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano, evidenciado pela cor azul inalterada (CLSI, 2013).

2.2.4 Teste de atividade modificadora por microdiluição

Para o teste de modulação, foram utilizadas apenas as linhagens multirresistentes. As drogas utilizadas nos testes foram os aminoglicosídeos e lincosamidas em uma concentração inicial de 1024 µg/mL. A CIM dos antibióticos foi determinada na presença ou na ausência de crescimento bacteriano sob concentrações sub-inibitórias (CIM/8) dos produtos. Foram distribuídos 100 µL da solução contendo BHI com o inóculo do microrganismo e o extrato com concentração inibitória em cada poço. Após isso, 100 µL do antimicrobiano foi adicionado no primeiro poço, em seguida, submetido a uma diluição 1:2 em série, variando as concentrações entre 512 a 8 µg /mL. Os ensaios foram realizados em triplicata. As placas foram incubadas por 24 h a 35 ± 2 °C e a atividade antibacteriana foi evidenciada pelo uso de resazurina sódica (CLSI, 2005).

2.2.5 Análise dos dados obtidos

Os testes foram realizados em triplicata e expressos pela média geométrica. A análise estatística foi aplicada à análise de variância de duas vias seguida pelo teste de *Bonferroni* utilizando o *software GraphPadPrism 5.0* e *Microsoft Office Excel*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a realização do teste de Concentração Inibitória Mínima, ou CIM, com as bactérias, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foram obtidos resultados $\geq 1024\mu\text{g/mL}$,

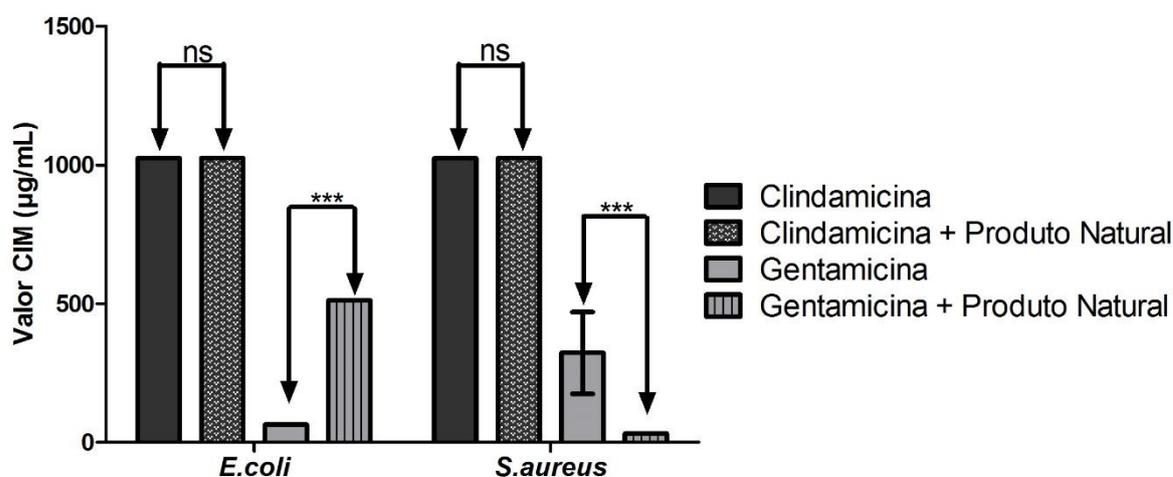
tanto nas cepas padrões como multirresistentes de *Escherichia coli*. Obtendo o mesmo resultado com as cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*.

O efeito causado pela associação do extrato com os aminoglicosídeos e lincosamidas é exposto na tabela 2 e na figura 1. Pode-se observar que ocorreu sinergismo entre o EHMP frente às cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes em associação com a gentamicina e que ocorreu anatogismo entre o EHMP e *Escherichia coli* multirresistente em associação com o mesmo medicamento ($p < 0,000,1$).

Todavia, na modulação de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multirresistentes em conjunto com o EHMP e o antibiótico clindamicina, não foi observado efeito modulatório nenhum nos testes.

Figura 1: Concentração inibitória mínima ou CIM ($\mu\text{g/mL}$) de aminoglicosídeos e lincosamidas na ausência e presença do Produto Natural, *Escherichia coli* multirresistente, *Staphylococcus aureus* multirresistente.

Fonte: Próprio autor



*** valor estaticamente significativo com $p < 0,001$

ns valor estaticamente não significativo com $p > 0,05$

Muitas das substâncias metabólicas secundárias exercem uma atividade antibacteriana, como a mentona, o mentol e o mentofurano, em suas respectivas concentrações decrescentes, a maior parte dessas moléculas apresenta uma sucinta ação antimicrobiana e um espectro de ação delimitado. Entretanto, quando estes são postos em associação com os antibióticos podem atuar modificando, potencializando ainda mais o efeito esperado do mecanismo de ação. Bem como alterando a resistência bacteriana frente a alguns antibióticos, conseqüentemente diminuindo a dose necessária da utilização dos antimicrobianos, obtendo um resultado realmente efetivo (VALMORBIDA et al., 2006, ZAGO et al, 2009).

A utilização conjunta de antibióticos pode acarretar diversos resultados, como o antagonismo que ocorre quando um antimicrobiano consegue inibir a ação de outro. Esse efeito pode ser atribuído aos compostos encontrados tanto nos antimicrobianos, como nos princípios ativos dos extratos, podendo diminuir consideravelmente seu efeito e seu espectro de ação. Existem relatos descritos sobre antagonismo entre a associação de antibióticos e com produtos de origem natural. Este efeito exige atenção, tendo em foco que o uso empírico de plantas medicinais em conjunto com a antibioticoterapia podem causar uma interferência relevante na eficácia do medicamento e do tratamento (DAMIANI et al., 2011, TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

Segundo Zago et al., (2011) que avaliou a atividade antibacteriana dos extratos da *Mentha piperita*, Canela, Alecrim, Cravo e Capim-cidreira, em conjunto com aminoglicosídeos, frente a cepas bacterianas de relevância nas infecções que acometem o organismo humano. Dentre os resultados, o extrato da Canela foi o que mais apresentou atividade antimicrobiana, logo após, o extrato da mentha piperita demonstrou eficácia sucintamente menor sobre as cepas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Segundo Marmitt et al., (2015) que realizou testes antimicrobianos e modulatórios utilizando extrato da mesma planta e diversos fármacos incluindo os da família das lincosamidas, como a clindamicina obteve resultados similares foram observados neste trabalho frente às cepas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* multirresistentes em associação com as lincosamidas e os aminoglicosídeos, como clindamicina e gentamicina.

Pesquisas realizadas por Baptista (2013) relatavam a importância sobre diversos mecanismos de defesa desenvolvidos pelas bactérias, o que lhes assegurou resistência aos demais fármacos utilizados. Um exemplo seria a bomba de efluxo, mecanismo característico de bactérias gram negativas, como a *Escherichia coli*, que propicia resistência aos antibióticos utilizados, podendo reduzir drasticamente seu efeito quando é utilizado em conjunto com alguma substância natural.

Pesquisas relacionadas com atividade antibacteriana com os produtos das plantas medicinais e o sinergismo com medicamentos vêm tornando-se cada vez mais relevantes e corriqueiros. Percebe-se que esta combinação pode servir como auxílio para uma nova estratégia no tratamento de quadros de infecções recorrentes. Essa estratégia pode ser realizada nos casos em que o antibiótico sozinho não demonstra real eficácia sobre determinada linhagem dos microrganismos (ANIBAL et al., 2014).

4. CONCLUSÃO

Conclui-se através desse estudo que o extrato hidro alcóolico da *Mentha piperita*, aplicado a metodologia e as cepas em questão, não pode ser considerado um inibidor da atividade bacteriana, por apresentar resultados de CIM clinicamente não relevantes. Em contrapartida, através da demonstração do efeito sinérgico do extrato em questão, observou-se atividade modificadora de antibiótico da classe das aminoglicosídeos sugerindo que o extrato pode conter substâncias que atuam potencializando o efeito do antibiótico, justificando seu uso empírico pelas populações desde as épocas mais remotas em forma de terapêuticos, como chás. Também deve-se levar em consideração que ocorreu atividade modificadora (antagonismo) frente a cepas de *Escherichia coli*, o que sugere uma atenção especial para efeitos contrários durante o uso simultâneo dessa planta medicinal e do antibiótico testado.

Desse modo, o presente estudo realizado obteve por finalidade, explanar a respeito dos efeitos observados da *Mentha piperita* frente as cepas visando contribuir com futuras pesquisas para a confirmação efetivados benefícios encontrados na utilização associada entre os medicamentos e as plantas medicinais na terapia das patologias encontradas.

REFERÊNCIAS

ANIBAL, F. F. et al. Composição farmacêutica, extrato vegetal e processo de preparação do mesmo. **Instituto Nacional de Propriedade Industrial**, v. 1, n. 1, p. 1-20, 2014.

ANVISA. **Manual de procedimentos básicos em microbiologia clínica para o controle de infecção hospitalar**, 1. ed. Ministério da Saúde, Brasília, 2000.

ANVISA. **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição**. 1 ed. The National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003.

BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de Resistencia aos Antibióticos**, Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Lusófona de Humanidade e Tecnologia, Lisboa, 2013.

CLSI. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada - Sexta Edição**, v. 23, n. 2, 2005.

CLSI. **The National Committee dor Clinical Laboratory Standards**, 1. Ed. Ministério da Saúde, Brasil, 2013.

DAMACENO, N. B; FARIAS, R. L. Relação Existente Entre Biofilmes Bacterianos, Quorum Sensing, Infecções E Resistência A Antibióticos: Uma Revisão Bibliográfica. **RPBeCS.**, v. 3n. 1, p. 46-51, 2016.

DAMIANI, et al., Néctar misto de Cajá-manga com Hortelã: composição química, microbiológica e sensorial. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.13, n. 3, p. 301-309, 2011.

FRED, C, T; ROBERT, C, M, J. The Rationale for Revising the Clinical and Laboratory Standards Institute Vancomycin Minimal Inhibitory Concentration Interpretive Criteria for *Staphylococcus aureus*. **CID.**, v. 44, n. 1, p. 1207-1215, 2007.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

KRYCHAK-FURTADO, S. **Alternativas fitoterápicas para o controle da verminose ovina no estado do Paraná: testes in vitro e in vivo.** Tese (Doutorado em Ciências) - Curso de Pós-graduação em Agronomia, Área de Produção Vegetal, Universidade Federal do Paraná, PR, 2006.

MARMITT, D. J. et al., Plantas Com Potencial Antibacteriano Da Relação Nacional De Plantas Medicinais De Interesse Do Sistema Único De Saúde: Revisão Sistemática. **Rev. Saúde Públ.**, v. 8, n. 2, p. 135-152, 2015.

PEREIRA, A. V. et al. Extratos vegetais: atividade antimicrobiana e genético sobre plasmídios de resistência a antibióticos em microrganismos. **Bio Far.**, v.4, n. 01, p. 60-65, 2010.

SCAVRONI. J.; et al. Redimento e composição química do óleo essencial da *Mentha piperita* L. submetida a aplicações de giberelina e citocinina. **Rev. Bras. Pl. Med.** v. 8, n. 4, p. 40-43, 2006.

SILVA, M. K. N.; CARVALHO, V. R. A.; MATIAS, E. F. F. Chemical Profile of Essential oil of *Ocimum gratissimum* L. and Evaluation of Antibacterial and Drug Resistance-modifying Activity by Gaseous Contact Method. **Pharmacognosy Journal**, v. 8, n. 1, 2016

SOUSA, E. O. et al. Atividade antibacteriana e interferência de *Lantana camara* L. e *Lantana montevidensis* (Spreng.) Briq. na resistência de aminoglicosídeos. **Rev. bras. Bioci.**, v. 9, n. 1, p. 1-5, 2011.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. Ed. Artmed Editora S.A. 2012.

VALMORBIDA, J. el al. Redimento e composição química dos óleos essenciais de *Mentha piperita* L. cultivados em solução nutritiva com diferentes concentrações de potássio. **Rev Bras Pl Med.**, v. 8, n. 4, p. 56-61, 2006.

ZAGO, J. A. A. et al. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Rev Bras de Farmacogn.**, v. 19, n. 4, p. 828-833, 2009.