

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

LUCAS DIÓGENES FERNANDES CASTRO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULATÓRIA POR CONTATO GASOSO
DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Hyptis martiusii* Benth**

Juazeiro do Norte – CE
2022

LUCAS DIÓGENES FERNANDES CASTRO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULATÓRIA POR CONTATO GASOSO
DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Hyptis martiusii* Benth**

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: Me. Cícero Roberto Nascimento Saraiva

LUCAS DIÓGENES FERNANDES CASTRO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULATÓRIA POR CONTATO GASOSO
DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Hyptis martiusii* Benth**

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: Me. Cícero Roberto Nascimento Saraiva

Data de aprovação: 21/06/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Me. Cícero Roberto Nascimento Saraiva
Orientador

Prof.^a Esp. Maria Dayane Alves de Aquino
Examinador 1

Prof.^a Esp. Francisco Yhan Pinto Bezerra
Examinador 2

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULATÓRIA POR CONTATO GASOSO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Hyptis martiusii* Benth

Lucas Diógenes Fernandes Castro¹; Cícero Roberto Nascimento Saraiva².

RESUMO

O objetivo geral desse trabalho foi realizar a atividade antibacteriana e modulatória por contato gasoso do óleo essencial de *Hyptis martiusii* Benth. As atividades foram executadas durante o período de maio de 2022. A espécie *Hyptis martiusii* Benth foi coletada no Fazenda Barreiro Grande - Crato (CE). A extração do óleo essencial de *Hyptis martiusii* Benth (OEHm) foi realizada utilizando-se sistema de arraste de vapor, e coletado em aparelho doseador tipo Cleavenger. A avaliação da atividade antibacteriana e modulatória foi testada frente as bactérias *Escherichia coli* 27 e *Staphylococcus aureus* 6338, onde essas linhagens foram semeadas em caldo BHI e ficaram incubadas à temperatura de 37°C. Em seguida foi utilizada a metodologia de contato gasoso. Para verificação da ação modulatória, foram utilizados os antibióticos: amicacina e gentamicina. Outras placas foram preparadas sem o OEHm, para posterior comparação entre placas com os antibióticos e placas com os antibióticos e produto natural. Para determinação dos halos de inibição, as placas foram incubadas na estufa a 37 °C por 24 h. Foi observado que o OEHm não apresentou atividade antibacteriana, e os valores da atividade modulatória não foram estatisticamente significativos frente as bactérias testadas. Conclui-se que os resultados obtidos no presente estudo são importantes, devido ao uso de *Hyptis martiusii* Benth pela população, sendo assim relevante avaliar sua eficácia e associação com antibióticos. Portanto, são necessários estudos mais aprofundados para verificação da ação do produto natural frente às espécies bacterianas.

Palavras-chave: Atividade antibacteriana. *Hyptis martiusii* Benth. Plantas medicinais.

ANTIBACTERIAL AND MODULATORY ACTIVITY BY GASEOUS CONTACT OF THE ESSENTIAL OIL FROM THE LEAVES OF *Hyptis martiusii* Benth

ABSTRACT

The general objective of this work was to carry out the antibacterial and modulatory activity by gaseous contact of the essential oil of *Hyptis martiusii* Benth. The activities were carried out during the period of May 2022. The species *Hyptis martiusii* Benth was collected at Fazenda Barreiro Grande - Crato (CE). The extraction of essential oil from *Hyptis martiusii* Benth (OEHm) was carried out using a steam drag system, and collected in a Cleavenger type dosing device. The evaluation of the antibacterial and modulatory activity was tested against the bacteria *Escherichia coli* 27 and *Staphylococcus aureus* 6338, where these strains were seeded in BHI broth and incubated at 37°C. Then, the gaseous contact methodology was used. To verify the modulatory action, antibiotics were used: amikacin and gentamicin. Other plates were prepared without the OEHm, for later comparison between plates with antibiotics and plates with antibiotics and natural product. To determine the inhibition halos, the plates were incubated in an oven at 37 °C for 24 h. It was observed that OEHm did not show antibacterial activity, and the values of modulatory activity were not statistically significant against the bacteria tested. It is concluded that the results obtained in the present study are important, due to the use of *Hyptis martiusii* Benth by the population, being therefore relevant to evaluate its

¹ Discente, Centro Universitário Dr. Leão Sampaio, ludigenes33@gmail.com

² Docente, Centro Universitário Dr. Leão Sampaio, ciceroroberto@leaosampaio.edu.br

effectiveness and association with antibiotics. Therefore, further studies are needed to verify the action of the natural product against bacterial species.

Keywords: Antibacterial activity. *Hyptis martiusii* Benth. Medicinal plants.

1 INTRODUÇÃO

A utilização popular de plantas medicinais com intenções preventivas e/ou na restauração da saúde é um dos conceitos mais antigos da humanidade frente às doenças que surgiram no passar dos tempos. No Brasil, o entendimento tradicional sobre seu uso é herdado através da união dos costumes dos povos Afrodescendentes, Europeus e Nativos (SÁ; ELISABETSKY, 2012).

Observando-se a incalculável riqueza da flora brasileira e as vivências interligadas ao saber popular sobre plantas medicinais, emprega-se a necessidade de relacionar, nesse contexto; o saber empírico com o acadêmico, o qual é cada vez mais dominante (SANTOS et al., 2009).

No Brasil, a fitoterapia está ganhando mais apoio e espaço nos órgãos de atenção à saúde. Com a aplicação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006) e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares - SUS (PNPIC), as quais pretendem melhorar a atuação do governo sobre plantas medicinais e fitoterápicos, garantindo o seu uso consciente e seguro. Essas políticas auxiliaram no crescimento da fitoterapia no Sistema Único de Saúde (MONTEIRO, 2016).

Com o desejo de aumentar a diversidade de fitoterápicos, que serão repassados pelo Sistema Único de Saúde foi publicada a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), a qual lista 71 espécies de ervas com propriedades farmacológicas. Essa lista tem o intuito de nortear os estudos para o desenvolvimento de novos fitoterápicos disponíveis para a população, com segurança e eficácia comprovadas (BRASIL, 2010).

Tais plantas compõem uma grande fonte de substâncias com propriedades biológicas. O uso delas, especialmente na cura de doenças infecciosas, simboliza uma importante contribuição para o desenvolvimento e busca de novos agentes terapêuticos que apresentem ação contra bactérias multirresistentes (OLIVEIRA, 2002).

Diante do interesse anunciado pelo SUS em adquirir novos conhecimentos sobre plantas medicinais e aprimorar o acervo científico já existente sobre ervas, entende-se a necessidade de desenvolver estudo acerca da *Hyptis martiusii* Benth, popularmente conhecida como Cidreira do campo ou Cidreira brava, cuja utilização é feita pela população, devido à facilidade com que a planta é encontrada na natureza (CALDAS, 2010).

Aliando o anseio de testar os benefícios de *Hyptis martiusii* Benth e a sua natividade nordestina, percebeu-se a viabilidade de realizar um estudo sobre a referida planta para contribuir, de maneira científica, nas pesquisas e informações sobre os benefícios que “cidreira do mato” pode oferecer, já que a planta é apontada como alternativa no combate de infecções e ferimentos.

Com isso, o objetivo desse trabalho foi realizar a atividade antibacteriana e modulatória por contato gasoso do óleo essencial de *Hyptis martiusii* Benth.

2 METODOLOGIA

As atividades foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Leão Sampaio (UNILEÃO), Juazeiro do Norte – CE. As atividades foram executadas durante o período de Maio de 2022.

A espécie *Hyptis martiusii* Benth foi coletada no Fazenda Barreiro Grande - Crato (CE). A identificação botânica e o depósito da exsicata foram realizados no Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima – HCDAL da Universidade Regional do Cariri – URCA. Número de identificação: 4610.

A extração do óleo essencial de *Hyptis martiusii* Benth (OE_{Hm}) foi realizada utilizando-se sistema de arraste de vapor, e coletado em aparelho doseador tipo Cleavenger, modificado por Gottlieb; Magalhães (1960). O procedimento se deu de forma que as folhas de *Hyptis martiusii* Benth foram colocadas em um balão de 5 litros juntamente com 2,5 litros de água, e mantido em ebulição por 2 horas. Após obtida a mistura água/óleo no doseador, esta foi separada, tratada com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e filtrada para haver separação total do óleo e da água.

O Meio Agar Mueller Hinton (MH) e Brain Heart Infusion Broth (BHI) foram os meios de cultura das cepas de escolha, preparado de acordo com as especificações sugeridas pelo fabricante. Os microrganismos utilizados nos testes são de linhagens resistentes *Escherichia coli* 27 e *Staphylococcus aureus* 6338, ambas disponibilizadas pelo Centro Universitário Leão Sampaio.

As linhagens foram inoculadas em caldo BHI, na concentração indicada pelo fabricante e ficaram incubadas durante 24 horas à temperatura de 37°C para propiciar o desenvolvimento das cepas bacterianas. Estas suspensões acrescidas de bactérias desenvolvidas foram diluídas na proporção de 1:10 em caldo BHI até o equivalente a 10⁵céls/mL (NCCLS, 2005).

Para realização da semeadura dos microrganismos, foram utilizadas placas de Petri contendo Agar Mueller Hinton (MH). Discos de papéis filtro semelhantes aos de antibiograma foram colocados no centro de cada placa sobre o semeio e 20 µL do produto testado foi acrescentado na tampa das placas. Para determinação dos halos de inibição, as placas foram incubadas na estufa a 37°C por 24 horas. Os testes foram realizados em triplicata e para medição dos halos foi utilizado uma régua milimétrica.

Para a realização atividade moduladora por contato gasoso em placas de Petri contendo Agar Mueller Hinton (MH), utilizou-se a metodologia modificada por Inouye; Takizawa; Yamaguchi (2001). Foram utilizados discos de antibióticos: amicacina e gentamicina. As placas foram invertidas e 20 µL do óleo essencial foram acrescentados nas tampas permitindo que a partir da volatilização ocorresse a interação com os discos. Outras placas foram preparadas sem o óleo para posterior comparação entre placas somente com os antibióticos e placas com antibióticos e óleo essencial. Para determinação dos halos de inibição, as placas foram incubadas na estufa a 37°C por 24 horas. Os testes foram realizados em triplicata e para medição dos halos utilizou-se uma régua milimétrica.

Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em média geométrica. Para análise estatística foi aplicada ANOVA two-way seguida do teste de Bonferroni, considerando significância de $p \leq 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

No presente trabalho foi verificado que o óleo essencial de *Hyptis martiusii* Benth não apresentou atividade antibacteriana, pelo método de contato gasoso.

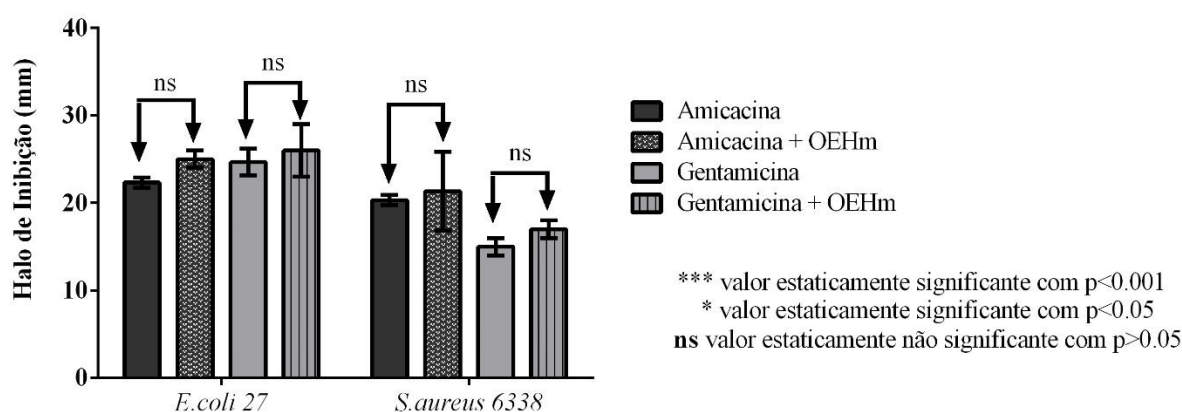
Em pesquisas realizadas por Figueirêdo et al. (2018), que analisaram a atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas de *Hyptis martiusii* Benth pela metodologia de microdiluição através da Concentração Inibitória Mínima (CIM), concluíram que nas espécies testadas: *Staphylococcus aureus* (SA-ATCC25923 e SA358), *Escherichia coli* (ATCC-CE10536 e CE27) e *Pseudomonas aeruginosa* (PA-ATCC15442 e PA03), o OEhm exibiu uma CIM de ≥ 1024 µg/mL contra estirpes de bactérias multirresistentes e padrão, sendo assim, não apresentou ação antibacteriana, resultado semelhante ao observado na presente pesquisa.

Já Oliveira et al. (2014), que pesquisaram a atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas de *Hyptis martiusii* Benth pela metodologia de microdiluição através da Concentração Inibitória Mínima (CIM), usando as espécies *E. coli* e *S. aureus* multirresistentes. Contra *S. aureus* multirresistente (SA358) a CIM ≥ 1024 µg/mL, não apresentou ação antibacteriana,

enquanto para *E. coli* multirresistente (EC27) mostraram resultados das CIMs eficazes com CIM de 64 µg/mL,

Em relação à associação do produto natural com antibióticos, foi verificado que o óleo essencial de *Hyptis martiusii* Benth não apresentou atividade modulatória significativa tanto para a cepa resistente de *Staphylococcus aureus*, quando associado com o antibiótico amicacina e gentamicina; quanto para a cepa resistente de *Escherichia coli* para os mesmos antibióticos. Porém houve aumento do halo de inibição em todos os antibióticos testados em associação com o OEHm, como apresentado no gráfico 1.

Gráfico 1: Potencial modulatório do óleo essencial de *Hyptis martiusii* Benth frente à *Escherichia coli* 27 e *Staphylococcus aureus* 6338.



Oliveira et al. (2014), que pesquisaram a atividade modulatória do óleo essencial das folhas de *Hyptis martiusii* Benth pela metodologia de contato gasoso, observaram que houve reduções significativas no crescimento bacteriano obtidos com *S. aureus* ATCC12692 para amicacina na concentração de 50% e 25% de EOHm. Outras sinergias foram observadas, como para *E. coli* ATCC25922 para tobramicina em contato gasoso do óleo essencial na concentração de 50% e 25% e *E. coli* 27 (multirresistente) para amicacina e tobramicina.

Em pesquisas realizadas por Coutinho et al. (2010), utilizando o extrato etanólico das folhas de *Hyptis martiusii* Benth (EEHM) pela metodologia de microdiluição através da Concentração Inibitória Mínima (CIM), usando as espécies *E. coli* multirresistentes (EC27) e associando com os antibióticos amicacina, canamicina, neomicina e gentamicina, obtiveram resultados satisfatórios. Houve efeito sinérgico com a combinação de EEHM e todos os aminoglicosídeos.

H. martiusii Benth pode representar uma fonte de produtos naturais com atividade antibiótica modificadora, sendo uma alternativa interessante para combater agentes infecciosos com multirresistência a antibióticos (COUTINHO et al., 2010).

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que os resultados obtidos no presente estudo são importantes, devido ao uso de *Hyptis martiusii* Benth pela população, sendo assim relevante avaliar sua eficácia e associação com antibióticos. Nessa pesquisa foi observado aumento no halo de inibição quando foi associado os antibióticos testados com o OEHm, porém os valores não foram estatisticamente significativos. Portanto, são necessários estudos mais aprofundados para verificação da ação do produto natural frente às espécies bacterianas.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. RE nº 14 de Março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília. DOU de 05/04/2010.
- CALDAS, G. F. R. et al., propriedades farmacológicas e toxicologia do óleo essencial de *Hyptis martiusii* Benth. (Cidreira-brava) e de seu composto majoritário 1,8-cineol: Uma revisão. **Revista Interfaces**, v. 8, n. 1, 2020.
- COUTINHO, H. D. M. et al. Additive effects of *Hyptis martiusii* Benth with aminoglycosides against *Escherichia coli*. **Indian Journal of Medical Research**. v. 131, n. 1, 2010.
- FIGUEIRÊDO, F. R. S. 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.
- GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T. Modified distillation trap. **Chemist Analyst**. v. 49, n. 1, 1960.
- INOUE, S.; TAKIZAWA, T.; YAMAGUCHI, H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 47, n. 5, p. 565-573, 2001.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Secretaria de Ciência e Tecnologia e Insumos estratégicos**. 2006. Disponível em <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf>. Acesso em: 15 de jan 2015.
- MONTEIRO, R. P. M.; **Desenvolvimento de perfis cromatográficos típicos e quantificação de polifenóis das folhas e cascas de *Anacardium occidentale***. Dissertação de

Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Recife. 2016.

NCCLS. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15 [ISBN 1-56238-556-9]. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2005.

OLIVEIRA, A. D. L. et al. Chemical Composition, Modulatory Bacterial Resistance and Antimicrobial Activity of Essential Oil the *Hyptis martiusii* Benth by Direct and Gaseous Contact. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**. v. 9, n. 3, 2014.

OLIVEIRA, C. M. **Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas In: França SC. Farmacognosia - da planta ao medicamento**. 4o edição, Ed. da UFSC, 2002.

SÁ, I. M.; ELISABETSKY, E. Medical knowledge exchanges between Brazil and Portugal: An ethnopharmacological perspective. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 3, p. 762-768, 2012.

SANTOS, E. B. et al. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, p. 321-324, 2009.