

INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE SOBRE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton urticifolius* Lam. (EUPHORBIACEAE)

Maíra Honorato de Moura Silva¹; Divanize Batista Sales Barros²; Antônio Fernando Moraes Oliveira¹.

¹Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal – PPGBV; Departamento de Botânica; Centro de Biociências; Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. E-mail: mairamhms@hotmail.com

²Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica; Centro de Biociências; Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

Introdução

Nas últimas duas décadas do século XX, o mundo vem sentindo necessidade de mais produtos naturais que possam ser utilizados principalmente para uso medicinal.

As plantas oferecem diversos compostos que podem apresentar efeito sobre organismos animais. E os óleos essenciais são frações voláteis naturais que conferem os aromas percebidos em algumas espécies vegetais que tem despertado um interesse considerável para utilização médica por todo mundo (LIN *et al.*, 2012) em virtude de sua complexa composição e seus efeitos farmacológicos que os tornam potenciais fontes para o desenvolvimento de novas drogas (SANTOS, 1997).

O crescente interesse por novos produtos naturais que possam agir como fármacos faz da Caatinga uma região de interesse devido sua grande biodiversidade. Por isso, as atividades de bioprospecção nesta região vêm buscando encontrar, nas espécies endêmicas, produtos naturais que possam ser utilizados pelo homem para os mais diversos fins terapêuticos, visando também maior conhecimento sobre as bioatividades das espécies nativas e de bioconservação desse bioma.

Vários fatores podem influenciar a qualidade da produção dos óleos essenciais, dentre eles os fatores genéticos, fatores técnicos – como época de colheita, transporte, secagem e armazenamento das amostras – e fatores ambientais – como temperatura, luminosidade e solo (BORSATO, 2007).

Com isso, a Caatinga, que apresenta um clima tipicamente semi-árido, com elevadas temperaturas, grande incidência de radiação solar, sazonalidade climática com chuvas escassas e mal distribuídas durante todo o ano, é um ecossistema com condições climáticas que influenciam muito na produção dos metabólitos secundários das espécies vegetais.

Essa influência do efeito sazonal sobre os óleos essenciais vem sendo demonstrado em seu rendimento, em sua composição e conseqüentemente sobre os efeitos bioativos, apresentando predominância de compostos nas estações mais secas, com maior radiação solar e altas temperaturas.

Um dos gêneros que merecem destaque nesse ecossistema é o *Croton* L., por ser o segundo maior e mais diverso da família euphorbiaceae, apresentando cerca de 1.200 espécies, onde 350 estão presentes no Brasil, 69 na Caatinga e 31 espécies no estado de Pernambuco.

Com isso, o objetivo deste trabalho foi verificar a influência da sazonalidade sobre o potencial antibacteriano dos OE's de folhas de *Croton urticifolius*.

Materiais e Métodos

❖ Coleta e processamento do material vegetal

As coletas de *Croton urticifolius* foram realizadas exclusivamente no perímetro da Caatinga, no Parque Nacional Vale do Catimbau, Buíque-PE, nas estações seca e chuvosa do ano de 2016. Folhas de indivíduos da espécie foram coletadas de uma mesma população de acordo com as técnicas usuais em taxonomia (MORI *et al.*, 1981).

❖ Extração e isolamento dos óleos essenciais

Os óleos essenciais de folhas de *Croton urticifolius* foram obtidos por hidrodestilação com água destilada, utilizando aparelho tipo Clevenger, por um período de três horas para cada planta (PEREIRA *et al.*, 2011). Em seguida, o óleo foi coletado e seco com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e mantido em refrigerador (-5 °C) num frasco de vidro âmbar até os ensaios biológicos.

❖ Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Preparação dos meios e das soluções dos OE's

Foram utilizados como meio de cultura para as bactérias, o meio sólido Müller Hinton Agar para determinar a Concentração Mínima

Bactericida (CMB) e o meio líquido Müller Hinton na microdiluição seriada na placa de 96 poços para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Em tubo estéril foram adicionados 200µl do OE de cada uma das espécies em estudo, 20µL de Tween 80 e q.s.p. 2mL de água destilada estéril, sendo agitado por 5 minutos usando-se aparelho Vortex, obtendo-se uma solução com concentração final de 100µl/mL do óleo essencial. A partir de tal solução, utilizando o procedimento de diluição seriada, foi obtida as demais soluções nas seguintes concentrações: 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78, 0.39µl/mL (ALLEGRIINI *et al.*, 1973 com modificações).

Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A avaliação antimicrobiana dos OE's foi realizada em modelo experimental de microdiluição seriada, conforme descrito pela CLSI (2009) em placas de 96 poços. Para determinar os valores do CIM foram usadas microplacas de 96 cavidades. Da solução mãe de 100µl/mL foi feita a diluição seriada dos OE's (50 a 0,39µl/mL) e adicionados 100µL de cada diluição ao meio apropriado. Em seguida, as placas foram inoculadas com 10µL de cada microrganismo, ajustadas à escala de MacFarland (10^7 UFC/ml), incubadas a 37°C por 24 horas e realizada a leitura das microplacas. A CBM foi determinada de acordo com os resultados da CIM. Alíquotas de 5µL de cada diluição que inibir o crescimento bacteriano foram semeadas em meio apropriado e incubadas a 37°C por 24 horas. A CBM foi determinada como sendo a concentração mínima que não apresentou crescimento bacteriano no meio de cultura após o período de incubação.

❖ Análise dos dados

Os dados foram submetidos à Análise de Variância- ANOVA (one way) utilizando o teste a posteriori de Tukey no Minitab 2016, adotando o nível de significância de 0,05 de probabilidade.

Resultados e Discussão

A atividade antibacteriana do óleo essencial foi testada pelo método de microdiluição seriada contra três bactérias, sendo sete cepas de

Staphylococcus aureus resistentes a metaciclina, outra gram-positiva, *Enterococcus faecalis*, e uma gram-negativas, *Klebsiella pneumoniae*.

O resultado presente na tabela 1 revela que o óleo essencial bruto de *C. urticifolius* foi capaz de inibir o crescimento de todas as bactérias testadas tanto na estação seca como na chuvosa, sendo mais eficiente na estação chuvosa para *Enterococcus faecalis* ($0,39 \pm 0,00$ $\mu\text{l/mL}$), *Klebsiella pneumoniae* ($18,75 \pm 6,25$ $\mu\text{l/mL}$) e contra as cepas *Staphylococcus aureus* 670 ($4,68 \pm 1,56$ $\mu\text{l/mL}$), *Staphylococcus aureus* 691 ($6,25 \pm 0,00$) e *Staphylococcus aureus* 731 ($9,29 \pm 3,00$), enquanto não foi eficiente na atividade bactericida em uma concentração abaixo de 100 $\mu\text{l/mL}$ para *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* 02 e *Staphylococcus aureus* 691 na estação seca e para *Enterococcus faecalis* na estação chuvosa.

O OE apresentou atividade bactericida com diferença significativa entre as estações, sendo mais eficiente na estação chuvosa para *Klebsiella pneumoniae* ($37,5 \pm 12,50$), *Staphylococcus aureus* 02 ($37,5 \pm 12,50$), *Staphylococcus aureus* 705 ($50 \pm 0,00$), *Staphylococcus aureus* 731 (CMB= $9,37 \mu\text{l/mL}$), *Staphylococcus aureus* 691 ($18,75 \pm 6,25$) e *Staphylococcus aureus* 670 ($18,75 \pm 6,25$).

TABELA 1: Atividade antibacteriana de óleo essencial de folha de *Croton urticifolius* (Concentração Inibitória Mínima – MIC; Concentração Bactericida Mínima - CMB em $\mu\text{l/mL}$).

Microrganismos	<i>Croton urticifolius</i>			
	2016			
	MIC		CMB	
	ES	EC	ES	EC
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$50 \pm 0,00$ a	$18,75 \pm 6,25$ b	>100 a	$37,5 \pm 12,50$ b
<i>Enterococcus faecalis</i>	$2,60 \pm 0,90$ a	$0,39 \pm 0,00$ b	>100 a	>100 a
<i>Staphylococcus aureus</i> 02	$16,66 \pm 7,21$ a	$12,5 \pm 0,00$ a	>100 a	$37,5 \pm 12,50$ b
<i>Staphylococcus aureus</i> 802	$20,83 \pm 7,21$ a	$12,5 \pm 0,00$ a	$50 \pm 0,00$ b	$100 \pm 0,00$ a
<i>Staphylococcus aureus</i> 659	$33,33 \pm 14,43$ a	$12,5 \pm 0,00$ a	$66,66 \pm 28,87$ a	$50 \pm 0,00$ a
<i>Staphylococcus aureus</i> 705	$33,33 \pm 14,43$ a	$12,5 \pm 0,00$ a	$100 \pm 0,00$ a	$50 \pm 0,00$ b
<i>Staphylococcus aureus</i> 731	$33,33 \pm 14,43$ a	$9,29 \pm 3,00$ b	$100 \pm 0,00$ a	$9,37 \pm 3,13$ b
<i>Staphylococcus aureus</i> 691	$25 \pm 0,00$ a	$6,25 \pm 0,00$ b	>100 a	$18,75 \pm 6,25$ b
<i>Staphylococcus aureus</i> 670	$12,5 \pm 0,00$ a	$4,68 \pm 1,56$ b	$83,33 \pm 28,87$ a	$18,75 \pm 6,25$ b

ES=Estação Seca; EC=Estação Chuvosa

Médias seguidas pela mesma letra entre as colunas não diferem estatisticamente entre si com $p \leq 0,05$ de probabilidade pelo teste de Tukey.

Assim, foi possível verificar a eficiência deste óleo sobre as bactérias testadas, ressaltando sua função bacteriostática, principalmente, sobre as cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes e sua maior atividade na estação

chuvosa, o que torna nula a hipótese de ser a estação seca o período de maior produção de compostos bioativos para esta espécie.

Contudo, corrobora com Costa *et al.* (2013) que ao analisar óleo essencial de *C. rhamnifolioides* também verificou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, apresentando valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) entre 2.5 - 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e 5 - 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectivamente, próximo aos intervalos de valores encontrados no presente estudo, cujos valores de MIC variaram entre 0.39 - 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e CMB entre 9.37 - 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Conclusão

Foi possível observar uma eficiente atividade antibacteriana do OE, sendo este, sobretudo bacteriostático com ação sobre as bactérias testadas nas duas estações, porém havendo uma influência da sazonalidade sobre a atividade do óleo essencial de *Croton urcitifolius*, apresentando maior inibição de crescimento e maior atividade bactericida na estação chuvosa.

Palavras-chave: Atividade antibacteriana; Caatinga; Croton; Óleos voláteis; Sazonalidade.

Fomento: Capes e Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Referências Bibliográficas

- ALLEGRI, J.; BOUCHBERG, M.S.; MAILLOLS, H. Emulsions d'huiles essentielles fabrication et applications em microbiologie. **Société de Pharmacie de Montpellier**, v. 33, n. 1, p.73-86, 1973.
- COSTA, A. C. V.; MELO, G. F. DO A.; MADRUGA, M. S.; COSTA, J. G. M.; GARINO JUNIOR, F.; QUEIROGA NETO, V. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of a *Croton rhamnifolioides* leaves Pax & Hoffm. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, p. 2853-2864, nov./dez. 2013.
- LIN, J.; DOU, J.; XU, J.; AISA, H. A. Chemical Composition, Antimicrobial and Antitumor Activities of the Essential Oils and Crude Extracts of *Euphorbia macrorrhiza*. **Molecules** 2012, 17, 5030-5039; doi:10.3390/molecules17055030
- PEREIRA, A.Q.; CHAVES, F.C.M.; PINTO, S.C.; LEITÃO, S.G.; BIZZO, H.R. Isolation and Identification of cis-7-Hydroxycalamenene from the Essential Oil of *Croton cajucara* Benth. **J. Essent. Oil Res.** 2011, 23, 20-23.



SANTOS, F. A. Atividade antibacteriana, antinoceptiva e anticonvulsivante dos óleos essenciais *Psidium guyanenses* PERS. e *Psidium pohlianum* BERG. Dissertação de mestrado, UFC, Fortaleza, 1997.