

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Calyptanthes spp.* (MYRTACEAE) FRENTE A BACTÉRIAS GRAM- POSITIVAS E GRAM-NEGATIVAS

Rayza Helen Graciano dos Santos (1); Elys Karine Carvalho da Silva (2); Maíra Honorato de Moura Silva (3); Maria Tereza dos Santos Correia (4)

Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (rayzahelen@hotmail.com) (1); Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (elyskarinec@gmail.com) (2); Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal (mairamhms@hotmail.com) (3); Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (mtscorreia@gmail.com) (4).

Resumo: As plantas constituem fontes naturais de diversas substâncias e metabólitos secundários. Os óleos essenciais são de fácil extração, economicamente viáveis e estão presentes em diversas partes das plantas além de possuírem um potencial farmacológico comprovado em estudos científicos. Com isso, objetivo do trabalho foi avaliar o efeito microbiano do óleo essencial de *Calyptanthes spp.* frente as cepas bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas incluindo algumas resistentes, afim de se conhecer se a planta pode ser usada como medicamentosa para o combate de infecções bacterianas. Para isso, foi extraído o óleo essencial de folhas de *Calyptanthes spp.*, coletadas no Parque Nacional Vale do Catimbau, Buíque-PE, por hidrodestilação durante 4 horas e em seguida o óleo essencial foi testado em diferentes concentrações diluídos em Tween 80 à 2% e a concentração mínima inibitória foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo Mueller-Hinton. Os inóculos foram preparados nos mesmos meios, a densidade ajustada para o tubo 0,5 da escala McFarland (10^8 para bactérias) e diluídas 1:10 para o procedimento de microdiluição. As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 horas. O CIM e o CMB foram realizados em triplicata e definidos como a menor concentração do óleo essencial que não demonstra crescimento bacteriano visível após o período de incubação. Não foi possível visualizar atividade bactericida e bacteriostática para o óleo essencial foliar de *Calyptanthes spp.* nas concentrações testadas, se fazendo necessário a realização de outros testes com concentrações maiores que 100 µg/ml afim de que seja comprovado seu potencial frente as cepas bacterianas.

Palavras-chave: Atividade Bacteriana; Bioatividade; Caatinga; *Calyptanthes*; Óleo essencial.

INTRODUÇÃO

As plantas constituem fontes naturais de diversas substâncias e metabólitos secundários. A riqueza destes compostos fundamenta a exploração das espécies vegetais desde a antiguidade, pois são capazes de conferir resistência ao ataque de pragas e de doenças. Com isso, as plantas se tornaram uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais, pode-se utilizar para a produção de inúmeros fármacos (WALL E WANI, 1996).

Entre as diversas espécies encontradas na caatinga, várias plantas são consideradas como medicamentosas de uso popular, pois diversos tecidos como folhas, cascas e raízes são comercializados em formas, muitas rudimentares, farmacêutica e pré-farmacêuticas em calçadas e ruas das principais cidades, bem como em mercados e feiras livres. O uso de plantas medicinais ainda é frequente, tanto no meio rural quanto no urbano, principalmente por parte

da população carente, que recorrem à vegetação nativa, em busca da cura para os problemas enfrentados (MOSCA; LOIOLA, 2009).

Dentre os agentes terapêuticos vegetais, os óleos essenciais constituem um grupo de substâncias líquidas, voláteis, responsáveis pelo odor aromático de diversas plantas (COSTA et al., 2008), a Caatinga apresenta-se como um bioma promissor para o estudo destas como possíveis fontes de moléculas com atividade farmacológica devido suas condições específicas de clima, solo, localização geográfica, exposição à luz solar e temperatura.

Este ecossistema apontado como rico em espécies endêmicas e bastante heterogêneo, corresponde a um habitat tipicamente ocupado por diversas espécies, dentre elas as da família Myrtaceae, apresentando algumas espécies endêmicas e muitas outras adaptadas a este bioma.

Atualmente, o interesse e pesquisa de novas substâncias bioativas derivadas de produtos naturais está crescendo, fato atribuído à constante necessidade de tratamentos mais eficazes e acessíveis e de fácil obtenção (MEOT-DUROS et al., 2008; SILVA-CARVALHO et al., 2015), entre essas substâncias se encontram os óleos essenciais (OEs). A família Myrtaceae compreende cerca de 150 gêneros, com aproximadamente 3.600 espécies. No Brasil, a família abrange 23 gêneros e cerca de 1.000 espécies (SOBRAL et al., 2015) e é considerada uma das famílias mais importantes economicamente, ocupando a oitava posição em diversidade no Nordeste (SOBRAL; PROENÇA, 2006). Uma das características marcantes desta família é a presença em seus órgãos vegetativos e reprodutivos, de estruturas secretoras de óleos essenciais (CRONQUIST, 1981).

As espécies da família Myrtaceae são bastante conhecidas e têm disso estudadas devido as suas características fitoquímicas, possuindo uma grande quantidade de metabólitos secundários que são associados a atividade antimicrobiana e a atividade antioxidante (BIANCHETTI, 2004; LOGUÉRCIO et al., 2005). Embora possuam muitos estudos de atividades e testes biológicos com espécies da família Myrtaceae, estudos com gênero *Calyptanthes* ainda são escassos, principalmente quando relacionados ao rendimento do óleo essencial e atividade biológicas.

A atividade antimicrobiana de óleos essenciais é avaliada através da determinação de uma pequena quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo testado (OSTROSKY et al., 2008). De acordo com o estudo de Bona et al. (2014), o método de microdiluição em caldo permite uma visualização da atividade inibitória dos óleos essenciais e extratos vegetais mesmo em baixas concentrações.

A maior parte da atividade antimicrobiana de óleos essenciais parece estar associada aos compostos fenólicos (SIMÕES; SPITZER, 2000), onde o efeito antimicrobiano está relacionado, principalmente, à alteração da permeabilidade e integridade da membrana celular bacteriana (LAMBERT et al., 2001).

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito microbiano do óleo essencial de *Calyptrocalyx* spp. frente as cepas bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas incluindo algumas resistentes, afim de se conhecer se a planta pode ser usada como medicamentosa para o combate de infecções bacterianas.

METODOLOGIA

- **Coleta do material**

As coletas das espécies de *Calyptrocalyx* spp. foram realizadas exclusivamente no perímetro da Caatinga (Vale do Catimbau, Buíque, PE) no mês de maio de 2018 (estação chuvosa). As coletas e observações de campo foram realizadas no Parque Nacional Vale do Catimbau, localizado a 285 Km do Recife. Fica situado entre o Agreste e o Sertão de Pernambuco, abrangendo terras do município de Buíque. O Parque é formado por elevações montanhosas de topo suave, encostas abruptas e vales abertos, distribuídos em aproximadamente 90.000 ha. Temperatura e precipitação médias anuais são de 25°C e 1.095,9 mm com maior pluviosidade entre abril a junho (SILVA; SCHLINDWEIN; RAMALHO, 2007).

Segundo o Ministério do Meio Ambiente (MMA) (2002), o PARNA do Catimbau é uma área de extrema importância para a conservação da biodiversidade. Do ponto de vista geomorfológico, o PARNA do Catimbau está inserido no Planalto da Borborema, apresentando relevo ondulado a fortemente ondulado, com altitudes variando de 650 a 1.000 m (CPRM 2005). Os solos são rasos a profundos, predominando Planossolo e Podzólico nas encostas e circundando a área serrana e Litólicos no topo das serras. O clima é do tipo tropical chuvoso, com verão seco (CPRM 2005).

- **Extração de óleos essenciais**

O óleo essencial de folhas de *Calyptrocalyx* spp. foi obtido em amostras de 100g de folhas frescas por hidrodestilação com água destilada, utilizando aparelho tipo Clevenger, por um período de quatro horas. 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 para os ensaios biológicos.

O rendimento do óleo essencial foi definido como o quociente do peso do óleo recolhido e o peso seco do material vegetal extraído (Equação 1) (SANTOS et al., 2014) e os dados foram submetidos e os dados obtidos foram submetidos à análise estatística com teste de média (Teste de Tukey 5%).

Equação 1 – Rendimento de óleo essencial:

$$\frac{PO}{PS} \times 100$$

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

A avaliação antimicrobiana do OE foi realizada em modelo experimental de microdiluição seriada, conforme descrito pela CLSI (2009) em placas de 96 poços. A concentração inibitória mínima das diferentes concentrações do óleo essencial diluídos em Tween 80 à 2% foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo Mueller-Hinton (NCCLS/CLSI, 2009). Os inóculos foram preparados nos mesmos meios, a densidade ajustada para o tubo 0,5 da escala McFarland (10⁸ para bactérias) e diluídas 1:10 para o procedimento de microdiluição seriada. As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Após o período de incubação na estufa foram acrescentados em todos os poços 20 µl de resazurina 0,1% em solução fisiológica 0,9% e as placas foram novamente incubadas por 2 horas. A leitura das placas com os microrganismos foi realizada através da comparação da turbidez das amostras nos poços antes de acrescentar a resazurina e após acrescentá-la, sendo que o aumento da turbidez ou opacidade no meio indica o crescimento de microrganismo (LENNETTE et al., 1985), a permanência da coloração azul indica a ausência de microrganismo e a mudança da coloração azul para rosa indica a presença de microrganismo.

O CIM foi realizado em triplicata e definido como a menor concentração do óleo essencial que não demonstra crescimento bacteriano visível. A CBM foi determinada como sendo a concentração mínima que não apresentar crescimento bacteriano no meio de cultura após o período de incubação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os óleos essenciais de espécies da família Myrtaceae têm apresentado resultados satisfatórios a diversas atividades realizadas, inclusive nas atividades microbianas frente a bactérias de interesse médico (SCHAPOVAL et al., 1994; SALVAGNINI et al., 2008; VICTORIA et al., 2012).

O óleo essencial teve a sua atividade antimicrobiana testada pelo método de microdiluição seriada contra seis bactérias, sendo três gram-positivas: *Staphylococcus aureus* e três gram-negativa: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* (cepas ATCC (American Type Culture Collection)) (Tabela 1). Duas das espécies de *S. aureus* (705 e 683) são resistentes a uma grande parte dos antimicrobianos β -lactâmicos e a Glicopeptídeos, Licosaminas, entre outros.

Microrganismo	Registro
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UFPEDA
<i>Escherichia coli</i>	UFPEDA
<i>Proteus mirabilis</i>	UFPEDA
<i>Staphylococcus aureus</i> 02	UFPEDA – Cepa padrão ATCC 6538
<i>Staphylococcus aureus</i> 683	Exsudato purulento
<i>Staphylococcus aureus</i> 705	Ferida operatória

Tabela 1 – Relação de microrganismo utilizados para o MIC e CMB.

Não foi possível visualizar atividade bactericida e bacteriostática para o óleo essencial foliar de *Calyptanthes spp.* nas concentrações testadas (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625; 0,781250; 0,390625 $\mu\text{g/ml}$) visto que a leitura visual apresentou MIC e CMB acima de 100 $\mu\text{g/ml}$ para todas as cepas bacterianas testadas tanto as gram-positivas quanto as gram-negativas (Tabela 2).

O resultado encontrado no presente estudo não indica que esta espécie não possua atividade bacteriana. Se faz necessário a realização de outros testes com concentrações maiores que 100 $\mu\text{g/ml}$ afim de que seja comprovado seu potencial frente as cepas bacterianas. Na literatura não há relatos de testes do óleo essencial da espécie e nem do gênero *Calyptanthes* para atividade antimicrobiana.

Microrganismo	MIC	CMB
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>100	>100
<i>Escherichia coli</i>	>100	>100
<i>Proteus mirabilis</i>	>100	>100
<i>Staphylococcus aureus</i> 02	>100	>100
<i>Staphylococcus aureus</i> 683	>100	>100
<i>Staphylococcus aureus</i> 705	>100	>100

Tabela 2 – MIC e CMB do óleo essencial de *Calyptanthus spp.* frente as cepas testadas.

CONCLUSÃO

Devido ao aumento da resistência dos microrganismos às drogas disponíveis há a procura de novas alternativas terapêuticas, sendo os óleos essenciais e seus constituintes um alvo promissor para o encontro de novos fármacos com atividade antimicrobiana.

Dessa forma, sugere-se novos testes a fim de identificar a atividade antibacteriana do OEs de *Calyptanthus spp.* e com isso, se comprovado a atividade do óleo, contribua para o desenvolvimento de novos produtos naturais no tratamento de doenças decorrentes de infecções bacterianas.

AGRADECIMENTOS

A CAPES por conceder a bolsa de estudos para pesquisa do mestrado, ao Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica - LEAF e ao Departamento de Bioquímica da UFPE pelo suporte na execução do experimento.

REFERÊNCIAS

BIANCHETTI, P. Avaliação da atividade antioxidante e antibacteriana de extratos aquosos e etanolicos de plantas da família Myrtaceae frente ao micro-organismo *Escherichia coli*, 72 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Centro Universitário Univates, Lajeado, 2014.

BONA, E. A. M.; PINTO, F. G. S.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C M.; MOURA, A. C. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. Arquivo do Instituto Biológico, São Paulo, 8: 218-225, 2014.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved Standard – 3.ed. Wayne,PA, 2008. (CLSI document M31-A3 Clinical and Laboratory Standards Institute).

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 8 Edition: Approved Standard M07-A8. Wayne, PA, USA: CLSI, 2009.

COSTA, MARCO ANTÔNIO C.; JESUS, JOSÉ G.; FARIAS, JOÃO G.; NOGUEIRA, JOÃO CARLOS M.; OLIVEIRA, ANDRÉ LUIZ R.; FERRI, PEDRO HENRIQUE. Variação estacional do óleo essencial em arnica (*Lychnofora ericoides* Mart.). Revista de Biologia Neotropical, 5: 53-65, 2008.

CRONQUIST, A. An Integrated System of Classification of Flowering Plants, Columbia University: New York, 1981.

LAMBERT, R.; SKANDAMIS, P.; COOTE, P. E.; NYCHAS, G. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of Applied Microbiology, 91: 453-462, 2001. doi: 10.1046 / j.1365-2672.2001.01428.x

LENNETTE, E. H.; BALOWS, A.; HAUSLER, W.J.; SHADOWMY, H.J. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1985.

LOGUÉRCIO, A. P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A. C.; HENZEL, A.; WITT, N. M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). Ciência rural, Santa Maria, v 35, n. 2, p. 371 -376, 2005.

MEOT-DUROS, L.; LE FLOCH, G.; MAGNÉ, C. Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species, J. Ethnopharmacol, 116: 258–262, 2008.

(83) 3322.3222

contato@conadis.com.br

www.conadis.com.br

MOSCA, V.M.; LOIOLA, M.I.B. Uso popular de plantas medicinais no Rio Grande do Norte, nordeste do Brasil. *Revista Caatinga*, 22: 225-234, 2009.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2): 301-307, 2008. <https://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200026>

SALVAGNINI, L.E.; OLIVEIRA, J.R.S.; SANTOS, L.E.; MOREIRA, R.R.D.; PIETRO, R.C.L.R. Avaliação da atividade antibacteriana de folhas de *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2): 241-244, 2008. <https://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200018>.

SANTOS, G.K.N.; DUTRA, K.A.; LIRA, C.S.; LIMA, B.N.; NAPOLEÃO, T.H.; PAIVA, P. M.G.; MARANHÃO, C.A.; BRANDÃO, S.S.F.; NAVARRO, D.M.A.F. Effects of *Croton rhamnifolioides* Essential Oil on *Aedes aegypti* Oviposition, Larval Toxicity and Trypsin Activity. *Molecules*, 19:16573-16587. doi: 10.3390/molecules191016573, 2014.

SCHAPOVAL, E.E.S.; SILVEIRA, S.M.; MIRANDA, M.L.; ALICE, C.B.; HENRIQUES, A.T. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 44: 137-142, 1994. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(94\)01178-8](https://doi.org/10.1016/0378-8741(94)01178-8).

SILVA, M., SCHLINDWEIN, C.; RAMALHO, M. Padrão De Forrageio de *Xylocopa* (Neoxylocopa) *Ordinaria* (Hymenoptera, Apidae) Em Ambiente De Caatinga, Vale Do Catimbau-Pernambuco. In: VIII Congresso de Ecologia do Brasil, Caxambu – MG. Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil. Minas Gerais, 2007.

SILVA-CARVALHO, R.; BALTAZAR, F.; ALMEIDA-AGUIAR, C. Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can Be explored for drug development, *Evid.-Based Complement. Alternat. Med.*, 1:29, 2015.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2000.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB171>. Acesso em: 03 de novembro de 2018.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.E.B. *Siphoneugena delicata* (Myrtaceae), a new species from the Montane Atlantic Forests of Southeastern Brazil. *Novon* 16: 530-532, 2006.

VICTORIA, F. N.; LENARDÃO, E. J.; SAVEGNAGO, L.; PERIN, G.; JACOB, R. G.; ALVES, D.; SILVA, W. P.; MOTTA, A. S.; NASCENTE, P. S. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. *Food and Chemical Toxicology*, 50: 2668–2674, 2012.

WALL, M. E; WANI, M. C. Camptothecin and taxol. From discovery to clinic. *Journal for Ethnopharmacology*, 51: 239-254, 1996.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V., Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Química Nova*, 24: 47-152, 2001.