



Efeito antimicrobiano e modulador do óleo essencial extraído da casca de frutos da *Hymenaea courbaril* L.

Gleilton Weyne Passos Sales^{1,*}; Andressa Hellen de Moraes Batista¹; Larissa Queiroz Rocha¹; Nádia Accioly Pinto Nogueira¹

¹ Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, UFC.

RESUMO

O Jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) possui um amplo histórico de utilização, seus frutos são compostos por óleos essenciais, taninos, substâncias amargas, matérias resinosas e pécnicas, amido e açúcares. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana e moduladora do óleo essencial extraído da casca de frutos da *Hymenaea courbaril* L. (OEHC) sobre cepas de *S. aureus* oxacilina sensíveis (OSSA) de referência. Para a avaliação da atividade antimicrobiana foram determinadas as Concentrações Inibitória (CIM) e Letal Mínimas (CLM) do OEHC e o efeito do tempo de exposição a concentrações do OEHC, o efeito modulador do OEHC sobre antibióticos de uso clínico foi avaliado pelo teste de difusão em ágar modificado. OEHC inibiu o crescimento das cepas de *S. aureus* ATCC 6538P (CIM = CLM = 0,28% v/v) e *S. aureus* ATCC 14458 (CIM = 0,28% v/v; CLM = 0,56% v/v). A CLM do OEHC foi capaz de inviabilizar as cepas OSSA testadas em 8 horas (*S. aureus* ATCC 6538P) e 24 horas (*S. aureus* ATCC 14458) e a CIM inibiu o crescimento de *S. aureus* ATCC 14458 até 48h de exposição. A ação moduladora do OEHC na atividade de antibióticos de uso clínico variou com o ATM e com a cepa testada. Os resultados encontrados mostram que o OEHC possui uma boa atividade antimicrobiana sobre a espécie Gram-positivo *S. aureus*, revelando seu efeito modulador sinérgico quando associado a antibióticos de uso clínico, demonstrando ser o OEHC um forte candidato para o desenvolvimento de fármacos com atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: Hymenaea. Planta medicinal. Óleo essencial. Testes de sensibilidade bacteriana. Potencialização da ação de fármacos. *Staphylococcus aureus*.

INTRODUÇÃO

Atualmente o mau e excessivo uso dos antibióticos em doses inferiores a que é sugerida em manuais terapêuticos, assim como condições de higiene precárias, o aumento de pacientes com sistema imunológico comprometido e a lentidão para o diagnóstico das infecções bacterianas têm favorecido o aumento da resistência microbiana não só nos hospitais, como também na comunidade, podendo atingir inclusive indivíduos saudáveis (Ferreira *et al.*, 2008).

Através de vários mecanismos de resistência o microrganismo pode resistir total ou parcialmente à ação de um ou mais antimicrobianos pertencentes a mesma ou a diferentes classes terapêuticas (Otaíza O'r, 2002). Dessa forma é preocupante o atual quadro de falta de sensibilidade microbiana aos antibióticos disponíveis, por isso surge a importância de formas terapêuticas alternativas eficientes (Texeira, 2009).

Devido a sua composição complexa, os óleos essenciais demonstram uma variedade de ações farmacológicas, tornando-os potenciais fontes para o desenvolvimento de novos medicamentos (Amaral, 2004). Seu uso como agentes antimicrobianos, oferece um baixo risco de desenvolvimento de resistência microbiana, pois apresentam uma complexa composição e sua atividade antimicrobiana pode estar relacionada a diferentes mecanismos de ação, o que dificulta a adaptações microbianas (Daferera *et al.*, 2003).

Associações de óleos essenciais e de seus compostos isolados (eugenol, timol, cavacrol, entre outros) com antimicrobianos mostraram resultados promissores sobre bactérias Gram-positivo e Gram-negativo sensíveis e resistentes a antibióticos em vários estudos de avaliação de atividade moduladora (Gallucci *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2006; Hemaiswarya & Doble, 2009; Zago *et al.*, 2009; Palaniappan & Holley, 2010; Duarte *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2013).

Do jatobá (*H. courbaril* L.) podem ser isolados óleos essenciais de seus frutos, folhas e resina; taninos, substâncias amargas, matérias resinosas e pécnicas, amido

Autor correspondente: Gleilton Weyne Passos Sales, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal do Ceará. Rua Capitão Francisco Pedro, 1210, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, Ceará. E-mail: gleilton@hotmail.com

e açúcares podem ser obtidos a partir da casca do tronco, resina e dos frutos (Panizza, 1997; Pinto *et al.*, 2000).

Assim as folhas, a casca, a resina e os frutos possuem compostos que agem como antimicrobianos, antifúngicos, antioxidantes, anti-inflamatórios, antiplasmódicos, larvicidas e moluscocidas, sendo estas atividades comprovados em vários estudos, o que valida sua longa história de uso medicinal (Stubblebine & Langenheim, 1980; Braga *et al.*, 2000; Köhler *et al.*, 2002; Lorenzi & Matos, 2002; Fernandes *et al.*, 2007; Jayaprakasam *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2007; Imai *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2008; Aguiar *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2010; Bastos *et al.*, 2011; Do Rosario *et al.*, 2011; Gonçalves *et al.*, 2011; Cecilio *et al.*, 2012).

Devido a carência de estudos, o presente trabalho se propôs de forma inédita a investigar a atividade antimicrobiana e moduladora do OEHC na atividade de antibióticos de uso clínico. E assim, esclarecer cientificamente seu uso popular e fornecer subsídios para o desenvolvimento novos estudos e tecnologias.

MATERIAL E MÉTODO

Material vegetal

O material botânico, frutos maduros de *H. courbaril* L., foi obtido na Chapada da Ibiapaba, município de Ubajara (CE) (-3° 50' 24.777", -40° 54' 35.3406"). A identificação da espécie foi realizada no Departamento de Biologia e a exsicata encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra (UFC), com número 53048.

Extração e análise dos constituintes do óleo essencial dos frutos de H. courbaril L. (OEHC)

O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação (Craveiro, 1981), a partir das cascas secas e trituradas dos frutos maduros de *H. courbaril* L. O estudo da composição química do óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM), em aparelho do tipo Shimadzu modelo GC/MS QP 5050^a, sob as seguintes condições: coluna capilar DB-%-dimetilpolisiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,30 mm), fluxo de 1 mL/mim de Hélio como gás de arraste, e gradiente de temperatura, de 10°C/mim (40-180°C) e de 40°C/mim (180-300°C), com a temperatura do injetor de 250°C; modo de injeção 0,1 µL (solução 10%), split 1:20, 500 ng na coluna. Os espectros de massa foram produzidos por impacto eletrônico (70 eV). Os componentes do OEHC foram identificados através da comparação de seus espectros de massa com espectros existentes na literatura, com espectros do bando de dados (NIS21 e NIS107) do equipamento e, também, pela comparação dos índices de retenção com aqueles da literatura (Adams, 2007). Os índices de retenção de Kovats (IK) foram determinados utilizando uma série homóloga de n-alcenos injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras, utilizando a equação de Van den Dool e Kratz (Van Den Dool & Dec Kratz, 1963).

Preparação das diluições do OEHC

Foram preparadas diluições seriadas do OEHC utilizando como solvente o Tween 80 a 1%. As concentrações de trabalho do OEHC foram (4,6; 2,3; 1,15; 0,56; 0,28; 0,14; 0,071; 0,035; 0,017; 0,085; 0,042; 0,021 % v/v).

Cepas microbianas

Foram utilizadas duas cepas microbianas de *Staphylococcus aureus* Oxacilina-sensível (OSSA) de referência provenientes da American Type Culture Collection (ATCC): *S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458.

Ensaio microbiológicos

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima CLM do OEHC

A determinação da CIM foi realizada em triplicata pelo método de microdiluição em caldo de cultura (Clisi, 2003b), em microplacas estéreis com 96 poços. Aliquotas (80 µL) das suspensões microbianas contendo um inóculo com cerca de 10⁶ UFC/mL das cepas *S. aureus* OSSA foram adicionados a cada poço da placa com 100 µL de caldo BHI e 20 µL das diferentes concentrações de OEHC. Aos poços-controle foram adicionados: meio de cultura, agente antimicrobiano e inóculo do microrganismo (inibição do crescimento microbiano), ou meio de cultura, Tween 80 a 1% e inóculo do microrganismo (não-inibição do crescimento microbiano). As placas foram incubadas a 35°C/24h, e inspecionadas visualmente. A CIM foi considerada a menor concentração do OEHC capaz de inibir completamente o crescimento microbiano, constatada pela ausência de turvação visível.

Determinação da Concentração Letal Mínima CLM do OEHC

Em condições assépticas, inóculos de 5 µL obtidos a partir dos poços das placas de microdiluição usadas para a determinação da CIM, sem turvação visível, foram semeados na superfície do ágar Plate-Count. Em seguida, as placas foram incubadas a 35°C/24h e as colônias crescidas na superfície do ágar foram contadas. A menor concentração do OEHC e da OXA capaz de determinar a morte de 99,9% das células microbianas (crescimento microbiano na superfície do ágar < 0,1% do inóculo inicial) foi considerada a CLM (Baron *et al.*, 1994).

Determinação do efeito do tempo de exposição ao OEHC na viabilidade microbiana

Aliquotas de 20µL de OEHC, em concentrações iguais a CIM e CLM previamente determinadas, foram adicionadas a poços de microplacas de 96 poços contendo 100 µL de caldo BHI e 80 µL de uma suspensão microbiana das cepas OSSA, com aproximadamente 10⁶ UFC/mL. As microplacas foram incubadas a 35 °C e alíquotas de 10µL foram retiradas e diluídas em solução salina 0,85% estéril, sendo estas semeadas em ágar Plate-Count pela técnica

da microgota (Romeiro, 2007), em intervalos de tempo predefinidos (0, 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas). A contagem das colônias crescidas nas placas foi realizada após 24 h/35 °C. O experimento foi realizado em triplicata.

Estudo do efeito modulador do OEHC na atividade de antibióticos de uso clínico

A ação moduladora do OEHC na atividade antimicrobiana de antibióticos (ATM) de uso clínico (OXA – Oxacilina 1µg, AMI – Amicacina 30µg, GEN – Gentamicina 30µg, CRX – Cefuroxima 30µg, CFO – Cefoxitina 30µg, CLO – Cloranfenicol 10µg, NET – Netilmicina 30µg, P/T – Piperacilina/Tazobactam 110µg, ERT – Ertapenem 10µg, MEM – Meropenem 10µg, VAN – Vancomicina 30µg, CLA – Claritromicina 15µg, CIP – Ciprofloxacina 5µg, CLI – Clindamicina 2µg) sobre cepas padrão OSSA foi determinada em triplicata pelo método de disco-difusão (Bauer *et al.*, 1966), modificado (Oliveira *et al.*, 2006). Os diâmetros dos HI de crescimento microbiano determinados por cada associação OEHC+ATM foram comparados aos determinados pelo ATM isoladamente. Foi considerado efeito sinérgico quando a combinação determinou um aumento do diâmetro de HI \geq que 2mm; efeito antagônico quando o diâmetro do HI determinado pela combinação foi menor que o do ATM isolado; e, efeito indiferente, quando a combinação determinou um aumento no diâmetro do HI do ATM $<$ 2mm. (Cleeland & Squires, 1991).

Aspectos éticos

De acordo com a Resolução 196/96 da CNS-MS, a presente pesquisa não necessitou de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, ofício N° 32/13.

RESULTADOS

A análise do OEHC revelou a presença de 23 compostos, todos pertencendo a classe dos sesquiterpenos (Tabela 1).

Pela técnica da microdiluição em caldo o OEHC apresentou uma excelente atividade antimicrobiana sobre as cepas de *S. aureus* testadas. Os valores de CIM foram iguais para as duas cepas (0,28% v/v), entretanto a cepa *S. aureus* ATCC 14458 mostrou-se menos sensível ação do OEHC, pois foi observado uma CLM de 2X CIM (0,56% v/v), enquanto para *S. aureus* ATCC 6538P o valor de CIM coincidiu com o valor de CLM (Tabela 2).

No experimento do efeito do tempo de exposição na viabilidade microbiana, o OEHC apresentou perfis de inibição distintos para as duas cepas testadas, eliminando-as em intervalos que variaram de 8 a 24 horas (Gráfico 1).

Na determinação do efeito modulador, o OEHC apresentou interações variadas na ação dos antibióticos, havendo principalmente modulações para o sinergismo e indiferença (Tabela 3).

Tabela 1: Constituintes químicos do OEHC

Pico	Constituinte	T.R (min)	I.KE	% Total
3	α -cubebeno	26,941	1343	1,24
4	α -copaeno	28,498	1376	8,46
5	β -cubebeno	29,096	1387	0,57
6	β -elemeno	29,207	1389	1,29
7	α -gurjeno	29,765	1400	0,54
8	(Z)- β -cariofileno	30,795	1421	17,56
9	β -copaeno	31,211	1429	0,64
10	α -trans-bergamoteno	31,501	1435	0,60
11	Aromadendreno	31,607	1437	0,83
12	α -humuleno	32,524	1456	3,26
13	Allo-aromadendreno	32,708	1459	0,60
14	γ -muuruleno	33,714	1479	4,01
15	Germacreno-D	33,992	1481	17,61
17	Trans-Muurolo 4-(14)5, dieno	34,367	1493	0,25
18	Biciclogermacreno	34,641	1498	6,46
19	α -muurolo	34,802	1501	0,67
20	Germacreno A	35,141	1508	0,39
21	γ -cadideno	35,497	1513	1,67
22	δ -cadideno	35,835	1522	4,43
23	Germacreno B	37,675	1559	4,46
25	Espatuleno	38,702	1580	2,63
26	Óxido de cariofileno	38,899	1584	14,65
28	1,2-epóxido Humuleno	40,117	1608	1,91
Total identificado				94,73%

T.R: Tempo de retenção (minutos). I.KE: Índice de Kovats experimental.

Tabela 2: CIM e CLM de OEHC para cepas padrão de *S. aureus*.

MICRORGANISMOS	OEHC (% v/v)	
	CIM	CLM
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	0,28	0,28
<i>S. aureus</i> ATCC 14458	0,28	0,56

Controle: Tween 80 a 1%. Volume de OEHC em cada poço: 20 uL. A CIM foi considerada a menor concentração de OEHC, capaz de inibir o crescimento das cepas de *S. aureus*, com ausência de turvação visível e a CLM foi considerada a menor concentração de OEHC, capaz de eliminar em 99,9% do crescimento celular.

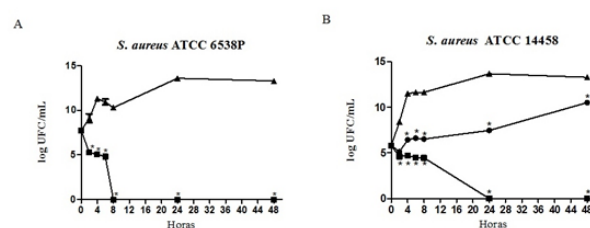


Gráfico 1: Efeito do tempo de exposição do OEHC na viabilidade de *S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 14458.

A - ■ (CIM = CLM: 0,28% v/v), ▲ (sem tratamento). B - ● (CIM: 0,28% v/v), ■ (CLM: 0,56% v/v), ▲ (sem tratamento). Os valores estão expressos pela média \pm EPM de três experimentos. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com * $p < 0,05$.

Tabela 3: Efeito modulador do OEHC na atividade antibacteriana de antibióticos de uso clínico sobre cepas de *S. aureus*

Antibióticos		Microrganismos	
		<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	<i>S. aureus</i> ATCC 14458
Oxacilina	HIATM	27 (S)	14 (S)
	HIOEHc-ATM	27 *	18,5 ↑
Amicacina	HIATM	24 (S)	19,5 (S)
	HIOEHc-ATM	26 ↑	22,5 ↑
Gentamicina	HIATM	20 (S)	21,5 (S)
	HIOEHc-ATM	20,5 *	22 *
Cefuroxina	HIATM	29,5 (S)	24,5 (S)
	HIOEHc-ATM	29,5 *	26,5 ↑
Cefoxitina	HIATM	31 (S)	26,5 (S)
	HIOEHc-ATM	29 ↓	25 ↓
Cloranfenicol	HIATM	24,5 (S)	9 (R)
	HIOEHc-ATM	24,5 *	11 ↑
Netilmicina	HIATM	22,5 (S)	19 (S)
	HIOEHc-ATM	25,5 ↑	22,5 ↑
Piperacina/ Tazobactam	HIATM	37 (S)	23 (S)
	HIOEHc-ATM	35,5 *	23 *
Ertapenem	HIATM	30,5 (S)	28 (S)
	HIOEHc-ATM	31,5 *	28,5 *
Meropenem	HIATM	42 (S)	38 (S)
	HIOEHc-ATM	40,5 ↓	40 ↑
Claritromicina	HIATM	34,5 (S)	28 (S)
	HIOEHc-ATM	37,5 ↑	32,5 ↑
Ciprofloxacina	HIATM	28,5 (S)	30,5 (S)
	HIOEHc-ATM	28,5 *	30,5 *
Clindamicina	HIATM	27 (S)	33 (S)
	HIOEHc-ATM	26,5 ↓	33 *
Vancomicina	HIATM	18,5 (S)	16 (S)
	HIOEHc-ATM	18,5 *	18 ↑

Média de três experimentos. (S) Sensível, (R) Resistente. HI: diâmetro do halo de inibição de crescimento em mm. HIOEHc-ATM: diâmetro do halo de inibição de crescimento determinado pela associação OEHC-ATM. HIATM: diâmetro do halo de inibição de crescimento determinado pelo antibiótico isolado. Efeito sinérgico (↑): HIOEHc-ATM ≥ HIATM + 2mm; Efeito antagônico (↓): HIOEHc-ATM < HIATM; Efeito indiferente ou aditivo (*): HIOEHc-ATM < HIATM + 2 (CLELAND; SQUIRES, 1991).

DISCUSSÃO

Lewinsohn & Prado (2005) estimaram entre 43 e 49 mil espécies de plantas presentes no Brasil, enquanto Forzza *et al.* (2010) publicaram uma lista com 40.982 espécies. Esta grande reserva natural de compostos orgânicos tem assumido um papel altamente importante na descoberta e no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos com atividade antimicrobiana (Cowan, 1999; Alves *et al.*, 2000).

O OEHC obtido a por hidrodestilação (Craveiro, 1981) apresentou-se como um óleo fino de cor verde claro e um forte odor amadeirado. A caracterização química do OEHC identificou 23 diferentes constituintes, todos da classe dos sesquiterpenos, sendo o germacreno-D (17,61%),

o (Z)-β-cariofileno (17,56%) e o óxido de cariofileno (14,65%) os constituintes majoritários.

Aguiar *et al.* (2010) isolaram do óleo essencial extraído dos frutos da *H. courbaril*, somente compostos sesquiterpenóides, sugerindo que os compostos monoterpênicos podem ser volatilizados durante o amadurecimento dos frutos.

Khoo *et al.* (1973) isolaram hidrocarbonetos sesquiterpênicos da resina presente nos frutos da *H. courbaril* L. Na resina bruta foram identificados o ciclosativeno, cariofileno, α-himachaleno, selina-4(14),7(II)-dieno como componentes majoritários e β-bourboneno, calareno, selina-4(14),7-dieno, humuleno, δ-cadineno, α-calacoreno e α-muurolelo como componentes minoritários.

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) é uma técnica quantitativa, pois possibilita conhecer qual a menor concentração necessária para inibir o crescimento bacteriano (Martins *et al.*, 2010).

Os valores de CIM do OEHC foram de 0,28% v/v para ambas as cepas. Em relação a CLM, o OEHC foi capaz de inviabilizar *S. aureus* ATCC 6538P na mesma concentração encontrada para a CIM (0,28% v/v) e *S. aureus* ATCC 14458 em uma concentração igual a 2X CIM (0,56% v/v).

Martins *et al.* (2010) utilizando o método de diluição em caldo na atividade antimicrobiana do extrato etanólico da casca e da polpa farinácea demonstraram que houve atividade antibacteriana com CIM na concentração de 350 µg/mL para o extrato bruto da casca de *H. courbaril*, frente aos isolados clínicos *S. aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

A maioria dos estudos que investigam a ação dos óleos essenciais sobre bactérias demonstra que os óleos essenciais são mais ativos sobre as cepas Gram-positivo (Burt, 2004). O conhecimento da cinética de crescimento microbiano fornece informações importantes para a realização de experimentos microbiológicos, pois avaliam a taxa de crescimento bacteriano e estabelecem os tempos de incubação necessários para cada ensaio (Silva, 2010).

A atividade bactericida de produtos naturais também podem ser avaliada através da realização de ensaios *in vitro* de tempo de morte. Este método, diferente dos ensaios de CIM e CLM, permite a determinação da cinética de morte microbiana (Aiyegoro *et al.*, 2009).

A CIM (=CLM) do OEHC foi capaz de inviabilizar a cepa *S. aureus* ATCC 6538P após 8 horas de contato, sendo que nas duas primeiras horas, reduziu em 31,91% o crescimento celular. A CLM do OEHC para o *S. aureus* ATCC 14458 foi capaz de reduzir 20,56% do crescimento microbiano nas duas primeiras horas de exposição, eliminando as células viáveis após 24 horas. Quando em CIM, o OEHC manteve o crescimento de *S. aureus* ATCC 14458 inferior ao da cultura controle não tratada, por 48h, inibiu em 11,61% o crescimento nas duas primeira horas de contato, manteve estável por 6 horas e em seguida permitiu um aumento progressivo, de até 55,17%, em relação ao inóculo inicial, ao final do período de exposição

Os resultados do estudo de cinética de morte bacteriana apresentados por Leite (2007) demonstram que a exposição por longos intervalos de tempos aos óleos essenciais promove uma acentuada taxa da morte microbiana.

Os óleos essenciais podem modular a atividade de antimicrobianos, seja através de um efeito antagônico ou sinérgico. Assim, o uso concomitante de produtos vegetais e medicamentos convencionais (antibióticos) merece um olhar cuidadoso (Rocha, 2012).

O OEHC foi capaz de modular a atividade antimicrobiana de diferentes antibióticos de uso clínico através de ação sinérgica ou antagônica, e em algumas situações não interferiu na ação dos antimicrobianos (ATM) isoladamente. Para a cepa *S. aureus* ATCC 6538P foram constatados: 21,44% de sinergismo (AMI, NET e CLA), 57,14 % de indiferença (OXA, GEN, CRX, CLO, P/T, ERT, CIP e VAN), e 21,42 % de antagonismo (CFO, MEM e CLI). Para a cepa *S. aureus* ATCC 14458 foram constatados: 57,14 % de sinergismo (OXA, AMI, CRX, CLO, NET, MEM, CLA e VAN), 35,72% de indiferença (GEN, P/T, ERT, CIP e CLI,) e 7,14% de antagonismo (CFO). As associações com AMI, NET e CLA foram as únicas com efeito sinérgico para ambas as cepas testadas. A GEN, P/T e o ERT, quando em associações com OEHC, não tiveram sua ação alterada e a associação OEHC-CFO foi a única com ação antagônica.

As pesquisas sobre efeito modulador de extratos de plantas e outros componentes tem-se tornado uma atividade fundamental nos últimos anos, já que a busca da melhora terapêutica consiste em variações positivas do efeito biológico resultante da mistura de compostos bioativos e substâncias antimicrobianas (Wagner, Ulrich-Merzenich, 2009).

Alguns trabalhos relatam o efeito modulador de óleos essenciais quando em associação com antimicrobianos clássicos (Oliveira *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2007; Rosato *et al.*, 2007; Duarte *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2013; Barreto *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2014).

Zago *et al.* (2009) avaliando a modulação de óleos essenciais na atividade de ATM sobre linhagens de *S. aureus* e *E. coli* isoladas de espécimes clínicos humanos, verificaram que *S. aureus* foi mais suscetível às associações de óleo essencial-ATM e que os óleos de capim cidreira e hortelã exercem efeito sinérgico na ação de oito e sete ATM testados, respectivamente.

Os resultados encontrados mostram que o OEHC possui uma boa atividade antimicrobiana sobre a espécie Gram-positivo *S. aureus*, revelando seu efeito modulador sinérgico quando associado a antibióticos de uso clínico, demonstrando que novos estudos com o OEHC e seus constituintes devem ser realizados.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro e a Universidade Federal do Ceará (UFC).

ABSTRACT

Antimicrobial effect and modulator of essential oil extracted from the fruits peel of Hymenaea courbaril L.

Jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) has an extensive history of use, its fruits are composed of essential oils, tannins, bitter substances, resinous and pectic materials, starch and sugars. The objective of this study was to evaluate antimicrobial activity and effect of essential oil extracted from the rind of fruits of *Hymenaea courbaril* L. (OEHC) about reference strains of *S. aureus* oxacillin susceptible (OSSA). For the evaluation of antimicrobial activity were determined Inhibitory (MIC) and Lethal (CLM) Minimum Concentrations from OEHC and the effect of time of exposure to concentrations of OEHC, OEHC modulator effect on antibiotics of clinical use was assessed by modified agar diffusion test. OEHC inhibited the growth of *S. aureus* strains ATCC 6538P (CIM = CLM = 0,28% v/v) and *S. aureus* ATCC 14458 (CIM = 0,28% v/v; CLM = 0,56% v/v). The CLM from OEHC was able to derail the OSSA strains tested in 8 hours (*S. aureus* ATCC 6538P) and 24 hours (*S. aureus* ATCC 14458) and the CIM inhibited the growth of *S. aureus* ATCC 14458 until 48 hours of exposure. The modulatory action of the antibiotic activity of OEHC clinical use ranged with the ATM and with the strain tested. The results show that the OEHC has a good antimicrobial activity on the species Gram-positive *S. aureus*, revealing its synergistic modulator effect when associated with antibiotics of clinical use, demonstrating the OEHC a strong candidate for the development of drugs with antimicrobial activity.

Keywords: *Hymenaea*. Medicinal plant. Essential oil. Bacterial sensitivity tests. Potentiation of drug action. *Staphylococcus aureus*.

REFERÊNCIAS

- Adams R P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th ed. Carol Stream: Allured Publishing; 2007.
- Aguiar JC, Santiago GM, Lavor PL, Veras HN, Ferreira YS, Lima MA, *et al.* Chemical constituents and larvicidal activity of *Hymenaea courbaril* fruit peel. Nat Prod Commun. 2010;5(12):1977-80.
- Aiyegoro O, Afolayan A, Okoh A. *In vitro* antibacterial time kill studies of leaves extracts of *Helichrysum longifolium*. J Med Pl Res. 2009;3(6):462-7.
- Alves TMdA, Silva AF, Brandão M, Grandi TSM, Smânia EdFA, Smânia Júnior A, *et al.* Biological screening of Brazilian medicinal plants. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2000;95(3):367-73.

- Amaral JFD. Atividade antiinflamatória, antinociceptiva, e gastroprotetora do óleo essencial de *croton sonderianus* muell. arg. [Dissertação]. Fortaleza, (CE). Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 2004.
- Barreto HM, Silva Filho EC, Lima EdO, Coutinho HDM, Morais-Braga MFB, Tavares CCA, *et al.* Chemical composition and possible use as adjuvant of the antibiotic therapy of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Ind Crops Prod.* 2014;59:290-4.
- Baron EJ, Peterson IR, Finegold SM. *Diagnostic Microbiology.* 9th ed. ed. Scott's B, editor. St. Louis: Mosby; 1994.
- Bastos GM, Nogueira NAP, Soares CL, Martins MR, Rocha LQ, Texeira AB. *In vitro* determination of the antimicrobial potential of homemade preparations based on medicinal plants used to treat infectious diseases. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2011;32(1):113-20.
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 1966;45(4):493.
- Braga FC, Wagner H, Lombardi JA, de Oliveira AB. Screening Brazilian plant species for *in vitro* inhibition of 5-lipoxygenase. *Phytomedicine: Int J Phytother Phytopharmacol.* 2000;6(6):447-52.
- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol.* 2004;94(3):223-53.
- Cecilio AB, de Faria DB, Oliveira Pde C, Caldas S, de Oliveira DA, Sobral ME, *et al.* Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. *J Ethnopharmacol.* 2012;141(3):975-81
- Cleeland R, Squires E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections. *Antib Lab Med.* 1991;3:739-87.
- CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically.* 2003b.
- Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(4):564-82.
- Craveiro AA. Óleos essenciais de plantas do Nordeste: Fortaleza: Edições UFC; 1981.
- Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protect.* 2003;22(1):39-44.
- Do Rosario MM, Kangussu-Marcolino MM, do Amaral AE, Noleto GR, Petkowicz CL. Storage xyloglucans: potent macrophages activators. *Chem Biol Interact.* 2011;189(1-2):127-33.
- Duarte A, Ferreira S, Silva F, Domingues F. Synergistic activity of coriander oil and conventional antibiotics against *Acinetobacter baumannii*. *Phytomedicine: Int J Phytother Phytopharmacol.* 2012;19(3):236-8.
- Fernandes TT, Santos ATFd, Pimenta C. Atividade antimicrobiana das plantas *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. *Jornal de Patologia Tropical.* 2007;34(2).
- Ferreira MVC, Paes VR, Lichtenstein A. Penicilina: oitenta anos; Penicillin: eighty years. *Rev med(São Paulo).* 2008;87(4):272-276.
- Forzza R, Leitman P, Costa A, Carvalho Jr A, Peixoto A, Walter B, *et al.* Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2010.
- Gallucci N, Casero C, Oliva M, Zygadlo J, Demo M. Interaction between terpenes and penicillin on bacterial strains resistant to beta-lactam antibiotics. *Mol Med Chem.* 2006;10(1):30-32.
- Gonçalves AL, Alves Filho A, Menezes H. Efeitos Antimicrobianos de Algumas Plantas Medicinais Brasileiras em Disordens Intestinais. *Rev Saúde Pesq.* 2011;4(2):153-60.
- Hemaiswarya S, Doble M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. *Phytomedicine: Int J Phytother Phytopharmacol.* 2009;16(11):997-1005.
- Imai T, Inoue S, Ohdaira N, Matsushita Y, Suzuki R, Sakurai M, *et al.* Heartwood extractives from the Amazonian trees *Dipteryx odorata*, *Hymenaea courbaril*, and *Astronium lecontei* and their antioxidant activities. *J Wood Sci.* 2008;54(6):470-5.
- Jayaprakasam B, Alexander-Lindo RL, DeWitt DL, Nair MG. Terpenoids from Stinking toe (*Hymenaea courbaril*) fruits with cyclooxygenase and lipid peroxidation inhibitory activities. *Food Chem.* 2007;105(2):485-90.
- Khoo S, Oehlschlager A, Ourisson G. Structure and stereochemistry of the diterpenes of *Hymenaea courbaril* (Caesalpinioideae) seed pod resin. *Tetrahedron.* 1973;29(21):3379-88.
- Köhler I, Jenett-Siems K, Siems K, Hernández MA, Ibarra RA, Berendsohn WG, *et al.* *In vitro* antiplasmodial investigation of medicinal plants from El Salvador. *Zeitschrift für Naturforschung C, J Biosci.* 2002;57(3-4):277-81.
- Leite AM. Avaliação da atividade biológica de óleos essenciais sobre espécies bacterianas potencialmente causadoras de endocardite infecciosa. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2007.
- Lewinsohn TM, Prado PI. Quantas espécies há no Brasil. *Megadiversidade.* 2005;1(1):36-42.
- Lorenzi H, Matos FJdA. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.* Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora; 2002.

- Martins CHG, Souza FR, Fonseca C, Casemiro LA, Furtado NAJC, Ambrosio SR, *et al.* Determinação *in vitro* da Atividade Antibacteriana dos Extratos Brutos da Casca e Polpa Farinácea de *Hymenaea courbaril* L. *Investigação*. 2010;10(2-3):37-43.
- Oliveira R, Lima EO, Vieira WL, Freire KL, Trajano V, Lima IO, *et al.* Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Rev Bras Farmacogn*. 2006;16(1):77-82.
- Oliveira RdAGd, Lima EdO, Souza ELd, Vieira WL, Freire KRL, Trajano VN, *et al.* Interference of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on the anti-*Candida* activity of some clinically used antifungals. *Rev Bras Farmacogn*. 2007;17:186-90.
- Otaíza O'R F. Políticas de control de antimicrobianos en el nivel hospitalario. *Rev Chilena Infectol*. 2002;19:219-21.
- Palaniappan K, Holley RA. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *Int J Food Microbiol*. 2010;140(2):164-8.
- Panizza S. Plantas que curam:(cheiro de mato). 15 ed. São Paulo: Ibrasa; 1997. 279 p.
- Pereira CKB, Rodrigues FFG, Mota ML, Sousa EO, Leite GO, Barros ARC, *et al.* Composição química, atividade antimicrobiana e toxicidade do óleo essencial de *Hymenaea courbaril* (jatobá). In: Química SBd, editor. 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química; Águas de Lindoia - SP-2007.
- Pereira V, Dias C, Vasconcelos MC, Rosa E, Saavedra MJ. Antibacterial activity and synergistic effects between *Eucalyptus globulus* leaf residues (essential oils and extracts) and antibiotics against several isolates of respiratory tract infections (*Pseudomonas aeruginosa*). *Ind Crops Prod*. 2014;52:1-7.
- Pinto JEBP, Santiago EJA, Lameira OA. *Compêndio de plantas medicinais*. Lavras: UFLA/FAEPE; 2000.
- Ribeiro DS, Melo DB, Guimarães AG, Velozo ES. Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana. *Semina: Ciências Agrárias*. 2012;33(2):687-96.
- Ribeiro DS, Velozo EdS, Guimarães AG. Interaction between the rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis* L.) and antimicrobial drugs in the control of bacteria isolated from foods. *J Biotechnol Biodiv*. 2013;4(1):10-9.
- Rocha LQ. Interferência do óleo essencial de folhas do quimiotipo II de *Lippia alba* (MILL.) NE BROWN na atividade antimicrobiana da oxacilina sobre *Staphylococcus aureus* oxacilina-resistente. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 2012.
- Romeiro R. Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão. Viçosa: UFV; 2007.
- Rosato A, Vitali C, De Laurentis N, Armenise D, Antonietta Milillo M. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomedicine*. 2007;14(11):727-32.
- Silva NCC. Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas [dissertação de mestrado]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências. 2010.
- Stubblebine W, Langenheim J. Estudos comparativos da variabilidade na composição da resina da folha entre árvore parental e prole de espécies selecionadas de *Hymenaea*: comparação de populações Amazônicas com uma população do sudeste brasileiro. *Acta Amazon*. 1980;10(2):293-309.
- Suzuki R, Matsushita Y, Imai T, Sakurai M, de Jesus JMH, Ozaki SK, *et al.* Characterization and antioxidant activity of Amazonian woods. *J Wood Sci*. 2008;54(2):174-8.
- Teixeira AB. Avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais das folhas dos quimiotipos I, II e III de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown [Dissertação]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 2009.
- Van den Dool H, Dec Kratz P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. *J Chromatogr A*. 1963;11:463-71.
- Wagner H, Ulrich-Merzenich G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*. 2009;16(2-3):97-110.
- Zago JA, Ushimaru PI, Barbosa LN, Fernandes Jr A. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. *Rev bras farmacogn*. 2009;19(4):828-33.

Recebido em 27 de fevereiro 2014

Aceito em 02 de agosto 2014

