

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE ÓLEO ESSENCIAL DE *ALGRIZEA MINOR* FRENTE A ESTIRPES DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Graziela Claudia da Silva¹; Luciclaudio Cassimiro de Amorim¹; Paloma Maria da Silva¹; Siomara Elis da Silva Lima¹; Maria Tereza dos Santos Correia¹

¹Universidade Federal de Pernambuco –Departamento de Bioquímica – Laboratório de Química de Produtos Naturais grazielaclaudiabio@gmail.com

1 Introdução

Desde tempos imemoriais, as plantas medicinais são largamente utilizadas no tratamento e prevenção de doenças, tendo seu uso ficado conhecido “fitoterapia”. Embora seja produzida uma larga escala de drogas para o tratamento de diversas patologias de origem bacteriana, o uso de fitoterápicos vem intensificando-se em diversos países, principalmente no Brasil, por possuir uma flora rica e diversa.

Atualmente, o mau e excessivo uso dos antibióticos em doses inferiores à que é sugerida em manuais terapêuticos, assim como as 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 à 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, surgindo, pois, a importância de se encontrar formas terapêuticas alternativas eficientes (Texeira, 2009).

Estudos *in vitro* destinados a determinar o potencial antimicrobiano da flora brasileira têm fornecido resultados satisfatórios (Fernandes et al., 2005; Gonçalves et al., 2005; Oliveira et al., 2007; Ushimaru et al., 2007), apesar de existir uma descontinuidade desses estudos e uma fragmentação dos resultados, travando, assim, avanços na área.

Myrtaceae é uma das mais importantes famílias de angiospermas sendo distribuída por todos os biomas brasileiros, com predominância na Mata Atlântica. É constituída por cerca de 3.500 espécies de plantas, distribuídas em 130 gêneros, dispersas nas regiões tropicais e subtropicais, sendo uma das mais importantes do neotrópico. No Brasil acredita-se que possam ocorrer aproximadamente 1.000 espécies (Proença et. al 2006). A Caatinga é um ecossistema do sertão nordestino. Estende-se por cerca de 735.000 km², sendo limitada a leste e a oeste pelas florestas Atlântica e Amazônica, respectivamente, e ao sul pelo Cerrado. Apresenta um clima semiárido, quente e com baixos índices pluviométricos, baixa umidade relativa do ar e altas temperaturas durante quase todo o ano (REIS et al., 2015). Como resultado dessas condições extremas de climas ao qual são expostas, as plantas da caatinga apresentam características químicas interessantes que podem ser investigados o seu potencial biotecnológico para aplicações como novos quimioterápicos.

Inicialmente classificada como uma espécie pertencente ao gênero *Myrcia*, pouco se sabe sobre as propriedades farmacológicas de *Algrizea minor* que foi reclassificada como membro do gênero *Algrezea* por Sobral, Faria Júnior & Proença (2010) através de estudos moleculares.

(83) 3322.3222

contato@conidis.com.br

www.conidis.com.br

Erroneamente ainda é conhecida como uma espécie de murta pela população do semiárido nordestino, sendo o produto da cocção das suas folhas indicada como expetorante e antissética do aparelho respiratório, sinusite, tosse e bronquite. Seu uso medicinal também está relacionado a tratamento de problemas do aparelho genito-urinário como cistite, corrimentos vaginais e uretrites.

Os óleos essenciais, cuja composição é complexa, 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).

Compostos biologicamente ativos extraídos de vegetais (cascas, folhas, raízes e frutos) vêm sendo estudados há décadas para elaboração de novas moléculas para os mais diversos fins terapêuticos. Muitas vezes, os estudos de atividade biológica são guiados pela tradicional medicina popular e, muitos deles, contribuem para a constatação científica das propriedades biológicas exploradas no uso de diversos extratos vegetais e óleos essenciais. Os óleos essenciais, por exemplo, têm servido de base para diversas aplicações na medicina popular devido às suas propriedades bactericidas, antifúngicas, anti-inflamatórias, anestésicos locais e aromáticos.

O isolamento de novas estruturas e agentes antimicrobianos com novos mecanismos de ação vem despertando a atenção de muitos pesquisadores. Inúmeras pesquisas *in vitro* mostram que a descoberta de novos agentes antimicrobianos é de suma importância, uma vez que o elevado potencial de recombinação genética das bactérias tem provocado o aumento de cepas multirresistentes e, conseqüentemente, tornado ineficazes muitos antibióticos disponíveis no mercado; logo, a busca por compostos com propriedades antibacterianas em extratos de plantas, óleos essenciais ou/e de substâncias mais específicas tem sido incentivada e intensificada.

Diante do exposto, essa pesquisa tem como objetivo relatar resultados preliminares do potencial antimicrobiano do óleo essencial extraído das folhas de *Algrizea minor* Sobral, Faria Júnior & Proença frente a estirpes de bactérias da espécie *Staphylococcus aureus*.

2 Metodologia

I - Coleta do material botânico

O material vegetal (folhas) foi coletado no Parque Nacional do Catimbau, no município de Buíque em Pernambuco. O material coletado foi processado conforme as técnicas usuais em taxonomia (Mori et al 1981), identificados e incorporados à coleção do herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA). O material vegetal a ser bioprospectado foi transportado em caixas térmicas até o Laboratório de Química de Produtos Naturais, do Departamento de Bioquímica da UFPE, para a extração dos óleos essenciais.

II - Extração dos óleos essenciais

Os óleos serão extraídos pela técnica de hidrodestilação (arraste de vapor) de acordo com Azmir *et al* (2013), a partir das folhas trituradas. Após quatro horas de extração, foram separadas as fases óleo/água no doseador, sendo a fase orgânica tratada com sulfato de sódio (NaSO₄) anidro, filtrada e armazenada em vidro âmbar sobre refrigeração a -4°C até a realização das análises.

III - Avaliação da atividade antimicrobiana

Os micro-organismos utilizados para os testes antimicrobianos foram quatro cepas de bactérias Gram-positivas obtidas da Coleção de Culturas UFPEDA, Departamento de Antibióticos, da Universidade Federal de Pernambuco. Sendo *Staphylococcus aureus* - UFPEDA-02 usada como cepa de referência, *Staphylococcus aureus*- UFPEDA 683 - isolada de exsudato purulento, *Staphylococcus aureus* - UFPEDA 731 – isolada de secreção de ferida operatória e *Staphylococcus aureus* - UFPEDA 733 isolada de fragmento ósseo (multiressistente) todas isoladas de Hospitais de referência em Saúde da região metropolitana do Recife (Pernambuco – Brasil).

Os isolados foram cultivados em Ágar de Baird-Parker e a identificação fenotípica de *S. aureus* foi baseado na morfologia das colônias (foram consideradas colônias típicas de *Staphylococcus aureus* pretas, circulares, convexas, cinza-escuro rodeadas por uma zona opaca e halo transparente), coloração de Gram, reação coagulase positiva e crescimento em ágar sal manitol (colônias positivas mudou a cor do meio de vermelho para amarelo). Em seguida, todos foram cultivados em Ágar Müller-Hinton (Merck), a partir de uma cultura recente (24h), por adição de solução salina a 0,9%. O inóculo foi preparado a uma concentração de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL, de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland. O ensaio para determinar a Concentração Inibitória Mínima do óleo essencial de *Algrizea minor* foi realizado em triplicata, através de métodos de microdiluição em caldo Müller-Hinton, para detectar possíveis atividades antimicrobianas do composto. Foram utilizadas microplacas estéreis de 96 poços de fundo chato e tampa nas quais foram distribuídos assepticamente, 100 µL de caldo Mueller-Hinton em todos os poços e adicionado na terceira fileira 100 µL da solução do óleo previamente preparada de acordo com Yamani et. al (2016). Em seguida as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Ao término da incubação, a mais baixa concentração que apresentou atividade, ou seja, não apresentou crescimento bacteriano, foi considerado como a Concentração Inibitória Mínima (CLSI, 2011). Aliquotas de 100µL dos poços que não apresentaram crescimento bacteriano visível foram semeados em ágar Muller Hinton e incubados por 24 horas com a temperatura de 37°C para determinação da Concentração Bactericida Mínima. Gentamicina a 120µg/ml foi usada como fármaco padrão.

3 Resultados e Discussão

O material botânico coletado, após a extração mostrou que as folhas *Algrizea minor* possui um bom rendimento de óleo essencial, com percentual de 0,198% em relação a massa OE/ massa vegetal. Os resultados do controle realizado com o antibiótico gentamicina na concentração de 120 µg/ml a cepa *Staphylococcus aureus* UFPEDA02 mostrou-se sensível, sendo as demais apresentando perfil resistente a este antibiótico. Foi considerado para análise o CIM₅₀, ou seja a concentração necessária do óleo essencial capaz de inibir 50% o crescimento bacteriano no período de 24h. Todos os ensaios realizados com óleo essencial de *Algrizea minor* indicaram como uma potente ação antibacteriana. Os resultados mostraram que o óleo foi especialmente eficaz contra as bactérias Gram-positivas, conforme demonstrado na Tabela 1. A CMI do óleo contra *S. aureus* – UFPEDA 02 foi de 15,63 µg/ml e CMB de 62,52 µg/ml; para a cepa *S. aureus* – UFPEDA 731 CMI 31,25 µg/ml e CMB de 125 µg/ml; para *S. aureus* – UFPEDA 733 o CMI 62,5 µg/ml no entanto, o CMB foi entorno de 250 µg/ml . Já em relação a cepa multirresistente de *S. aureus* – UFPEDA 683, o óleo apresentou CMI de 4000µg/ml, concentração extremamente alta para o estudo de óleos essenciais. Todavia nas demais cepas, os CMI revelados foram inferiores a concentração do antibiótico de referência utilizado nos tratamentos de infecções causadas por estes microrganismos.

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CMB) do óleo essencial de *Algrizea minor* em função das bactérias avaliadas.

Bactérias Gram positivas	CIM ₅₀ µg/ml	CMB µg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 02	15,63	62,52
<i>Staphylococcus aureus</i> UFPDA 731	31,25	125
<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 733	62,5	250
<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 683	-	-

*(-) CIM ou CMB >1000 µg/ml

Para Nascimento et.al (2014) atividades variáveis entre as diluições analisadas pode ocorrer devido ao agravamento da resistência bacteriana que está associada ao uso frequente e indiscriminado de antimicrobianos, bem como através de alterações na parede celular por meio da presença de genes que expressam resistência a múltiplos antimicrobianos. Sendo assim, no presente estudo, as atividades variáveis das diferentes diluições podem ter ocorrido em função da susceptibilidade dos isolados avaliados. A atividade de plantas típicas de regiões do semiárido também tem sido investigada por Da Silva Bessa e colaboradores (2016) frente a estirpes de *Staphylococcus aureus* com perfis resistentes, onde foi evidenciado a forte atividade de óleo essencial de *Syagrus coronata* sobre Gram positivos.

4 Conclusão

Em resumo, o óleo essencial extraído de *Algrizea minor* mostrou forte atividade antimicrobiana frente às estirpes de *Staphylococcus aureus* (incluindo multirresistente), quando comparado com a Concentrações Inibitória Mínima de antibiótico convencional usado no tratamento de infecções causadas por esses microrganismos. Uma análise detalhada dos compostos voláteis encontrados no óleo essencial de *Algrizea minor* a partir de folhas pode revelar quais os compostos majoritários responsáveis por essa ação bactericida e bacteriostática em diferentes concentrações. Espécies de *Staphylococcus aureus* são principais agentes patogênicos causadores de infecções de pele e dos tecidos moles, onde o óleo essencial *Algrizea minor* poderá ser um valioso agente antimicrobiano tópico para o tratamento de infecções da pele causadas por estes organismos ou como um penso para ferida para prevenir a infecção. Tratamento ou medidas preventivas iniciais podem interromper a progressão para infecção mais séria que requer terapia antibiótica sistemática, e reduzir o risco de desenvolvimento de resistência aos antibióticos disponíveis no mercado.

5. Referência

- AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMANA, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMEDA, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, p. 426-436, 2013.
- DA SILVA BESSA, Cibele Maria Alves et al. *Syagrus coronata* seed oils have antimicrobial action against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 10, n. 23, p. 310-317, 2016.
- DUARTE, S.; KOO, H.; BOWEN, W. H.; HAYACIBARA, M. F.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; PARK, Y. K.; ROSALEN, P. L. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on

(83) 3322.3222

contato@conidis.com.br

www.conidis.com.br

glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, Tokyo, v. 26, n. 4, p. 527-531, Apr. 2003.

FERNANDES, T.T.; SANTOS, A. T. F.; PIMENTA, F. C. Atividade antimicrobiana das plantas *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. *Rev. Patologia Tropical*, v. 34 (2) : 113-122, maio-ago. 2005.

GONCALVES, A. L.; ALVES, F. A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Inst Biol* 72: 353-358, 2005.

HOYOS, J. M. *Alterações ultraestruturais e atividade antifúngica em Pseudocercospora griseola e Colletotrichum lindemuthianum tratados com óleos essenciais e controle alternativo da antracnose do feijoeiro*. 2012. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MUHLEN, C. V. Índices de retenção em cromatografia gasosa bidimensional abrangente. *Scientia Chromatographica*. v. 1,n. 3, p.21-29, 2009.

NASCIMENTO, Jorge Messias Leal et al. Ação antimicrobiana de óleo essencial frente a cepas bacterianas contaminantes de alimentos. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 8, n. 3, p. 221-225, 2015.

PROENÇA, Carolyn EB et al. *Algrizea* (Myrteae, Myrtaceae): a new genus from the Highlands of Brazil. *Systematic Botany*, v. 31, n. 2, p. 320-326, 2006.

REIS, R.L.S. et al. Evaluation of biotechnological potential os *Asergillus parasiticus* UCP 1281 in the wastewater biotreatment of dairy industry and lipids production. *E-xacta*, Belo Horizonte, v. 8, n. 1, p. 31-42. (2015). Editora UNIBH.

SANTANA, HT. et al. Essential oils of leaves of Piper species display larvicidal activity against the dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Rev. bras. plantas med.* [online]. 2015, vol.17, n.1, pp.105-111. ISSN 1516-0572. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/13_052.

SOBRAL, M.; FARIA, J. E. Q.; PROENÇA, C. E. B. A new species of *Algrizea* (Myrteae, Myrtaceae) from Bahia, Brazil. *Neodiversity*, v. 5, p. 1-6, 2010.

SOUZA, I. M.; FUNCH, L. S.; QUEIROZ, L. P. Flora da Bahia- Gênero *Hymenaea* (LEGUMINOSAE, CAESALPINOIDEAE). In: Anais de resumos do 64º Congresso Nacional de Botânica, Belo Horizonte, 2013.

STADNIK, A.M.S.; PROENÇA, C.E.B. *Algrizea* in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB126966>>. Acesso em: 21 Out. 2016.