



IV Congresso Nacional de Microbiologia Clínica On-line

ATIVIDADE ANTIBIÓTICA EM *Staphylococcus aureus* E *Serratia marcescens* COM EXTRATOS DE ALECRIM (*Rosmarinus officinalis* L.) E ARRUDA (*Ruta graveolens* L.)

GENOILSON DE BRITO ALVES; MAGALI CANHAMERO; BEATRIZ COUTINHO
DIAS; BRUNA DE TORRES BESERRA; LUÍSA LASSO RAPOSO

RESUMO

O uso de infusões de plantas para controle de enfermidades é uma prática frequente na história humana, o entendimento dos efeitos causados pode ampliar o uso ou alertar para riscos de acordo com sua finalidade. Frequentemente infecções oportunistas ocorrem no ambiente hospitalar representando cerca de 30,4% dos óbitos em crianças, revelando a importância de obtermos novos fármacos para controle microbiano. Através do processamento das folhas de arruda (*Ruta graveolens* L.) e de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), formulamos quatro tipos de compostos para teste: extratos aquosos, extrato alcoólico, material em pó e óleo essencial. Mensuramos a ação inibidora sobre a proliferação das bactérias *Staphylococcus aureus* (SA) e *Serratia marcescens* (SM), obtendo redução de 44,4% da população de SA com uso de extrato alcoólico, e uma média de redução de 64% na população de *Serratia marcescens* com os diferentes extratos testados. O controle microbiano é essencial para o sucesso terapêutico e para segurança dos trabalhadores de múltiplas profissões que envolvem a microbiologia.

Palavras-chave: Antibiógrama, Extrato fitoterápico, Microbiologia.

1 INTRODUÇÃO

As bactérias *Staphylococcus aureus* e *Serratia marcescens*, podem ser encontradas na microbiota humana e animal, mais especificamente nas fossas nasais, garganta, intestino e pele. Entretanto, quando se deslocam para outras regiões, podem ocasionar desde simples infecções como espinhas e furúnculos até infecções hospitalares graves como pneumonia, meningite, septicemia, endocardite, entre outras (SANTOS et al., 2007; CARVALHO et al., 2010). Devido à resistência bacteriana aos antibióticos mais utilizados na população, é necessário a busca por novos fármacos, e neste cenário, as plantas podem representar uma excelente alternativa, porque naturalmente são expostas a uma grande diversidade de microrganismos. As plantas popularmente conhecidas como Alecrim e Arruda são bem difundidas e utilizadas na cultura brasileira, para saber se elas podem ser uma alternativa terapêutica, testamos diferentes extratos destas plantas sobre o crescimento de bactérias bem frequentes em clima tropical avaliando a atividade antimicrobiana dos extratos alcoólicos, extratos aquosos, do material em pó e do óleo essencial do alecrim e da arruda no combate às cepas de *S. aureus* e *S. marcescens*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta das Espécies

As folhas de arruda e alecrim foram adquiridas na Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP), localizada na Vila Leopoldina no estado de São Paulo. As plantas foram lavadas em água corrente e secas com papel toalha.

2.2 Microrganismos testados

Foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™ e *Serratia marcescens* ATCC® 14756™. As culturas foram cultivadas em ágar nutriente e condicionadas em incubadora à 28°C por 24h. Após incubação as bactérias foram semeadas em novas placas contendo ágar Mueller Hinton pelo método de esgotamento.

2.2 Maceração

Pesou-se 8,5g das folhas de cada planta, em seguida estas foram maceradas manualmente com auxílio de almofariz e pistilo até atingirem uma solução homogênea sem fragmentos visível, utilizando como solvente 30ml de álcool de cereais. Após este processo, os extratos foram filtrados através de papel filtro quantitativo.

2.3 Extração do óleo essencial pelo sistema Clevenger

A extração do óleo essencial foi realizada pelo método de hidrodestilação utilizando o aparelho Clevenger (WASICKY, 1963). Pesou-se 150g das folhas de cada planta. Em seguida, estas foram transferidas para balões de destilação de 500 ml do sistema Clevenger, contendo 300 ml de água destilada. Após 4 horas o sistema foi desligado e coletou-se o óleo essencial de alecrim e o óleo essencial de arruda, que foram armazenados em tubo Falcon e mantidos sob refrigeração à 6°C, durante 21 dias. Amostras de hidrolato foram coletadas periodicamente durante todo o processo de hidrodestilação.

2.4 Extração por decocção

Pesou-se 20g das folhas de cada planta (arruda e alecrim), as quais foram fracionadas com auxílio de bisturi, em seguida 10g das folhas de cada planta foram inseridas separadamente em Erlenmeyers com 100 ml de água destilada e 100 ml de álcool de cereais. Todos foram cobertos por placas de petri. A decocção do material vegetal ocorreu durante 15 minutos, com a água e o álcool em ebulição. As soluções alcoólicas e aquosas foram filtradas e estocadas em balões volumétricos de 100 ml, os quais foram envoltos com plástico filme e papel alumínio e armazenados durante 5 dias em local seco e sem luminosidade. As soluções foram agitadas durante um minuto diariamente.

2.6 Teste de sensibilidade do material das plantas em pó

O material da planta em pó foi obtido a partir da secagem das folhas das plantas durante 35 minutos a 50°C, em forno elétrico convencional. Após esse processo as folhas secas foram trituradas durante 7 minutos em um processador convencional e em seguida, peneiradas.

Pesou-se 0,100g do material em pó de cada planta, e aplicamos seguindo a metodologia padrão para antibiograma, descrita a seguir.

2.7 Técnica de difusão em disco

Aplicando o método de Kirby & Bauer, utilizamos discos para antibiograma, estes foram embebidos no álcool de cereais e no óleo essencial. Os discos foram aplicados sobre as cepas cultivadas no ágar Mueller Hinton, incubadas na estufa por 24 a 28°C. Após a incubação, foi realizada a leitura dos resultados, através da medição do diâmetro dos halos de inibição, expressas em milímetros da zona de inibição do crescimento bacteriano (Guimarães et al. 2017).

2.8 Análise Estatística

A análise estatística foi obtida através do teste One-way ANOVA, seguido por análise do Teste de Bonferroni. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do Software

GraphPad Prism 5.

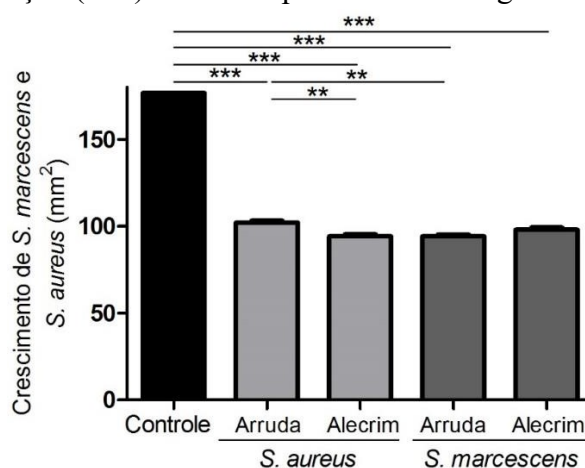
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para entendermos se a forma de exposição da fitoterápica influência de diferentes formas sobre a proliferação microbiana, preparamos quatro compostos diferentes: extrato alcoólico; extrato aquoso; material das plantas em pó e óleo essencial, e comparamos a eficiência frente as bactérias.

3.1 Maceração das folhas

A aplicação dos extratos alcoólicos revelou-se positiva para controle da proliferação bacteriana. O extrato de arruda reduziu em 43% a proliferação de *S. aureus* e de 48,4% sobre a bactéria *S. marcescens*. Já com o extrato de alecrim, houve redução de 54,3% na população de *S. aureus* e de 48,3% sobre as cepas de *S. marcescens*. É possível identificar uma inibição semelhante entre as duas bactérias com o uso do extrato de arruda (Figura 1).

Figura 1 - Halos de inibição (mm) formados pelos extratos vegetais alcoólicos



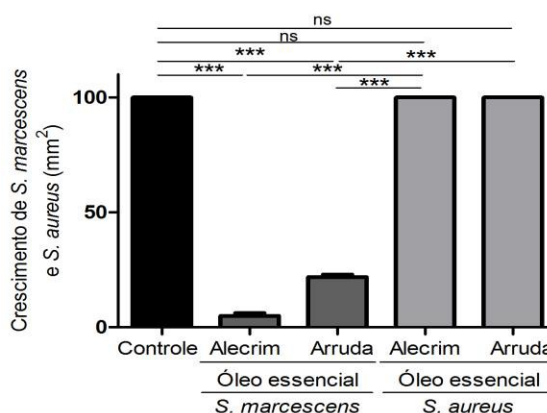
Os asteriscos acima das linhas representam as diferenças significantes entre as barras indicadas com * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Fonte: Acervo Pessoal

O potencial inibitório do alecrim sobre a bactéria *S. aureus* difere do obtido por Alvarenga *et al.* (2007), que constatou ausência de halo de inibição do extrato alcoólico. Esta diferença de resultado pode ser devido ao solvente utilizado para a obtenção do extrato, pois Alvarenga *et al.* (2007) utilizou etanol/água (70% v/v). O potencial inibitório da Arruda sobre a bactéria *S. aureus* corrobora com Pandey *et al.* (2011), eles utilizaram 500ml etanol 75% para 35 g da planta em pó. Enquanto, os resultados obtidos no presente trabalho, apontam que a diminuição no volume de amostra (8,4g p/ 30mL de álcool de cereais), também é eficiente no controle do crescimento bacteriano.

3.2 Antibiógrama com óleo essencial

O óleo essencial de *R. graveolens* e *R. officinalis* não apresentaram efeito inibitório sobre a bactéria *S. aureus* (Figura 2), corroborando com os achados de Araújo (2003); Neves *et al.* (2017) e Cutrim *et al.* (2019). No teste realizado sobre a bactéria *S. marcescens* os dois extratos foram eficientes com inibição de 78,5% na proliferação com o óleo de arruda e 94,9%, de redução com o óleo de alecrim (Figura 2). O resultado obtido pelo óleo essencial de alecrim no combate a bactéria *S. marcescens*, concorda com o de Ouibrahim, Ahmed *et al.* (2013), pois este observou halo de inibição de 11.5- 8.4mm.

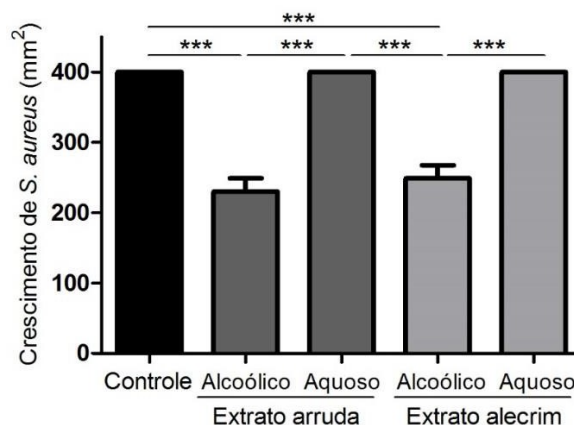
Figura 2 - Halo de inibição (mm) formados pelos óleos essenciais.

Os asteriscos acima das linhas representam as diferenças significantes entre as barras indicadas com * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Fonte: Acervo pessoal.

3.4 Extração por decocção

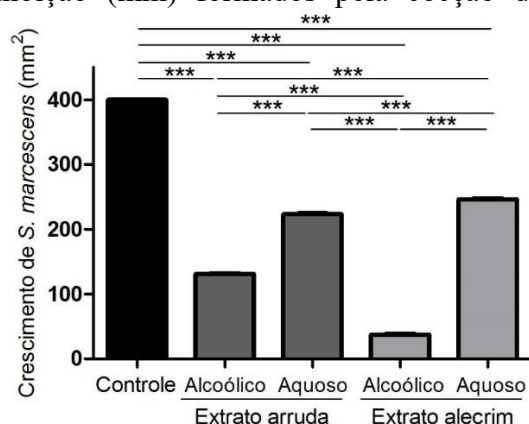
A partir das soluções alcoólicas feitas pelo método de cocção, mensuramos atividade inibitória de 47,1% e 33,2% sobre a proliferação de *S. aureus* para as soluções com arruda e alecrim respectivamente soluções na concentração 10%. As soluções aquosas de alecrim e arruda não apresentaram halos de inibição no combate a *S. aureus* (Figura 3), concordando com o resultado obtido por Guimarães et al. (2017).

Figura 3 - Halos de inibição (mm) formados pela cocção das plantas na bactéria *S. aureus*.

Os asteriscos acima das linhas representam as diferenças significantes entre as barras indicadas com * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Fonte: Acervo pessoal

As soluções alcoólicas de alecrim e arruda 10% reduziram respectivamente 90,7% e 67,2% a população da bactéria *S. marcescens*. Os extratos aquosos também demonstraram eficiência, com redução de 38,5% obtido com extrato aquoso de arruda e redução de 44,2% com extrato aquoso de alecrim (Figura 4).

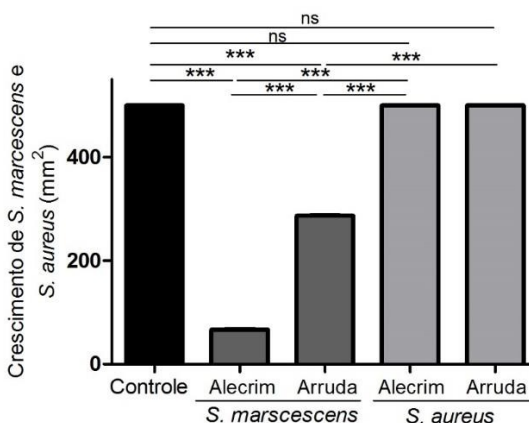
Figura 4 - Halos de inibição (mm) formados pela cocção das plantas na bactéria *S.*

marcescens.

Os asteriscos acima das linhas representam as diferenças significantes entre as barras indicadas com * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Fonte: Acervo pessoal.

As amostras em pó de alecrim e de arruda não apresentaram halo inibitório para a bactéria *S. aureus*. No entanto, mostrou-se eficiente no controle da proliferação *S. marcescens* inibindo em 86,7% sua população com pó de alecrim e 42,7% com a arruda em pó (Figura 5).

Figura 5 - Halos de inibição (mm) formados pelo material em pó das plantas.

Os asteriscos acima das linhas representam as diferenças significantes entre as barras indicadas com * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Fonte: Acervo pessoal

3.5 Álcool de cereais

Para testar se o solvente era o fator de inibição nos testes realizamos o antibiograma apenas com o álcool de cereais e não houve formação de halo de inibição para as bactérias testadas. Comprovando, que a inibição era proveniente dos metabólitos das plantas e não apenas do solvente.

4 CONCLUSÃO

O uso do extrato de Alecrim e Arruda são eficientes para controlar a proliferação das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Serratia marcescens*, com eficiência dependente da forma de administração.

REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, A.L. et al. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.9, n.4, p.86-91, 2007.
- AZWANIDA, Nik Nur. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. **Medicinal & Aromatic Plants**, [s.l.], v. 04, n. 03, p.1-6, 2015. OMICS Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>
- CARVALHO, Raimundo Gladson Corrêa et al. Caracterização fenotípica e genotípica de *Serratia marcescens* provenientes de Unidade Neonatal de Referência em Belém, Pará. **Revista Pan-amazônica de Saúde**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.101-106, mar. 2010.
- CUTRIM, Elaine S. M. et al. Evaluation of Antimicrobial and Antioxidant Activity of Essential Oils and Hydroalcoholic Extracts of *Zingiber officinale* (Ginger) and *Rosmarinus officinalis* (Rosemary). **Revista Virtual de Química**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.60-81, 2019. Sociedade Brasileira de Química (SBQ).
- GUIMARÃES, Caroline de Castro et al. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato aquoso e do óleo essencial do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e do cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 15, n. 2, p.83-89, abril./jun. 2017. Trimestral. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/3877>>. Acesso em: 1 out. 2023.
- OUIBRAHIM, Ahmed et al. “Evaluation of antibacterial activity of *Laurus nobilis* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Ocimum basilicum* L. from Northeast of Algeria.” (2013).
- SANTOS, J. A. A. et al. Diagnóstico e educação em saúde no uso de plantas medicinais: relato de experiência. **Rev. Ciênc. Ext.** v.12, n.4, p.183-196, 2016.
- SHAHIDI BONJAR, G. H. Evaluation of Antimicrobial Properties of Iranian Medicinal Plants against *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* and *Bordetella bronchiseptica*. **Asian J Plant Sci**. 2004;3(1):82–86.
- WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de Clevenger para extração de óleos essenciais. *Revista Faculdade de Farmácia e Bioquímica*, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 77-81, 1963.