

Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides* Cham. sobre isolados biológicos de *Staphylococcus aureus*

SILVA, V.A.^{1*}; FREITAS, A.F.R.¹; PEREIRA, M.S.V.¹; SIQUEIRA JÚNIOR, J.P.¹; PEREIRA, A.V.²; HIGINO, J.S.³

¹Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Biologia Molecular, Campus I, Cidade Universitária, CEP: 58051-900, João Pessoa-Brasil *viviane.biologia@hotmail.com/ nanda.biologia@hotmail.com/ vieirapereira@uol.com.br ²Universidade Federal de Campina Grande, Avenida Universitária, Bairro Jatobá, s/n, CEP: 58700-910, Patos-Brasil andreiaivet@hotmail.com ³Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Farmácia, Avenida Prof. Artur de Sá, s/n, CDU, CEP: 50670-901, Recife-Brasil

RESUMO: *Staphylococcus aureus* apresenta-se como microrganismo patogênico clássico sendo comumente reconhecido como agente etiológico de infecções hospitalares e comunitárias. Através do conhecimento das propriedades biológicas da *Lippia sidoides* Cham., conhecida como alecrim-pimenta, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato metanólico desta planta em inibir o crescimento de isolados biológicos de *S. aureus* de origem humana hospitalar. Utilizou-se o método de difusão em Agar Muller Hinton para se determinar a Concentração Inibitória Mínima do extrato. A atividade anti-estafilocócica do extrato da *Lippia sidoides* Cham. foi observada-pela formação de halos de inibição do crescimento bacteriano (9 a 27 mm), todas as amostras ensaiadas mostraram-se sensíveis à ação do extrato da *Lippia sidoides* Cham. até a diluição de 1:16 (0,053 g mL⁻¹). Nas condições desse estudo, esses resultados mostram promissora atividade antibacteriana do extrato de *Lippia sidoides* Cham.

Palavras-chave: alecrim-pimenta, atividade antibacteriana, infecção nosocomial, *Lippia sidoides*, *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT: *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of *Lippia sidoides* Cham. extract on biological isolates of *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* is a classic pathogenic microorganism commonly recognized as etiological agent of community and nosocomial infections. Considering the knowledge of *Lippia sidoides* Cham. (Alecrim-pimenta) biological properties, this study aimed to evaluate *in vitro* the antimicrobial activity of the extract from this plant in inhibiting the growth of *S. aureus* from hospitalized humans. The Agar Mueller-Hinton diffusion method was used to determine the Minimum Inhibition Concentration of the extract. The anti-*Staphylococcus aureus* activity of *Lippia sidoides* Cham. extract was noted by the large growth inhibition zones (9 to 27 mm); all tested samples were sensitive to the action of *Lippia sidoides* Cham. extract until the dilution of 1:16 (0.053 g mL⁻¹). Under the conditions adopted in the present study, these results show the promising anti-staphylococcal property of *Lippia sidoides* Cham. extract.

Key words: "alecrim-pimenta", antimicrobial activity, nosocomial infection, *Lippia sidoides*, *Staphylococcus aureus*

INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Staphylococcus*, família Micrococcaceae, são cocos gram-positivos com diâmetros médios entre 0,5 e 1,5 µm, imóveis, não esporulado e geralmente não capsulado; isolados aos pares, em cadeias curtas, ou agrupados irregularmente com aspectos semelhantes a cachos de uva e catalase positivos (Tortora et al., 2003; Harvey & Gilmour, 2005;

Cassetari et al., 2005).

Atualmente, o gênero *Staphylococcus* possui 33 espécies, sendo que 17 delas podem ser isoladas de amostras biológicas humanas. A espécie mais importante do gênero é *Staphylococcus aureus* (Santos et al., 2007). Patógenos da microbiota normal da pele e das vias respiratórias podem causar

infecções, com frequência associadas a dispositivos e aparelhos implantados, principalmente em pacientes imunocomprometidos, muito jovens ou idosos (Brooks et al., 2000). Segundo Vandenberg & Verbrugh (1999), o portador dessa bactéria exerce papel importante na epidemiologia e na patogênese de infecção, sendo o maior fator de risco para o desenvolvimento de infecções hospitalares adquiridas na comunidade.

Para Metam et al. (2005), cerca de 50 a 87% das infecções hospitalares, tem *Staphylococcus* como agente responsável, sendo que em 16 a 43% dos casos os pacientes evoluem para óbito em função do amplo espectro de resistências desses microrganismos aos antimicrobianos.

O controle de disseminação de espécies de *Staphylococcus* spp. resistentes a antimicrobianos é desafio. Nos últimos anos, a resistência de microrganismos patogênicos a múltiplas drogas tem aumentado devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, utilizados no tratamento de doenças infecciosas. Essa situação vem despertando o interesse dos cientistas na busca de novas drogas. As plantas constituem em uma excelente fonte de substâncias para novas drogas antimicrobianas, tendo em vista que a diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese química (Novais et al., 2003).

Lippia sidoides Cham., nativa do Nordeste do Brasil e no Norte de Minas Gerais, pertence à família Verbenaceae é conhecida popularmente como alecrim-pimenta ou estrepa-cavalo (Martins et al., 2000). É um grande arbusto caducifólio, ereto, muito ramificado e quebradiço, possui cerca de 2 a 3 m de altura, os frutos são do tipo aquênio, muito pequenos e as sementes raramente germinam (Lorenzi & Matos, 2002).

Nas folhas da *Lippia sidoides* Cham. encontram-se até 4,5% de óleo essencial rico em timol, princípio ativo responsável pelo seu cheiro característico (Matos, 2002). São geralmente utilizadas para tratamento de acne, ferimentos, infecções da pele e do couro cabeludo. A infusão tem sido utilizada popularmente em inalações, rinite alérgica e no tratamento das infecções da boca, da garganta e da vagina (Matos & Oliveira, 1998).

O extrato da *Lippia sidoides* Cham. apresenta forte ação contra fungos, bactérias e outros organismos, tais como, *S.aureus*, *Streptococcus mutans* responsável pela cárie dentária, *Corynebacterium xerosis* que causa mau cheiro nas axilas e nos pés, *Candida albicans* encontrada nas infecções da boca e no corrimento vaginal, *Trichophyllum rubrum* e *Trichophyllum interdigitale* agentes de micoses na pele. Apresenta ação moluscida contra o caramujo *Biomphalaria glabra*, hospedeiro da esquistossomose e ação larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti*, transmissor da dengue (Lemos et al., 1990; Lacoste et al., 1996; Matos, 2000).

Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides* Cham. sobre isolados de *S.aureus* de origem humana hospitalar.

MATERIAL E MÉTODO

Material Botânico

Foram utilizadas folhas de *Lippia sidoides* Cham. (alecrim-pimenta) da família Verbenaceae, cultivadas no Horto de plantas medicinais do Laboratório de Tecnologia Farmacêuticas (LTF) da Universidade Federal da Paraíba. As folhas foram coletadas no início da floração e secas em estufa a 40°C.

Obtenção do Extrato

Para a obtenção do extrato foi empregado o método de lixiviação em fluxo contínuo à temperatura ambiente com solução extratora de álcool metanol a 80% v/v renovado constantemente por um período de 24 horas, obtendo-se 500 mL de concentrado. A extração foi realizada no Laboratório de Tecnologia Farmacêuticas do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco. O extrato puro apresenta concentração de 0,86 g mL⁻¹.

Amostras bacterianas

Foram utilizados vinte isolados biológicos de *S. aureus* obtidos a partir de pacientes internados no Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba. Estes foram caracterizados fenotipicamente como sensíveis e resistentes a metilicina e duas cepas padrões de *S. aureus* ATCC 6538 e a 33591 utilizadas como controle de referência em todos os experimentos realizados.

Determinação da Atividade Antimicrobiana do Extrato da *Lippia sidoides* Cham.

A atividade antimicrobiana do extrato de *Lippia sidoides* Cham. foi analisada pelo método de difusão em placas de Petri contendo Agar Muller Hinton. Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) os isolados de bactérias foram cultivados em caldo nutritivo BHI - Brain Heart Infusion (DIFCO); a 37°C por período de 18-24 horas. A partir desse cultivo foram realizadas diluições 10⁻² em caldo nutritivo e estes foram semeados em Agar Mueller Hinton (DIFCO) por inundação. Foram realizadas perfurações no meio de cultura de aproximadamente 6 mm de diâmetro e nestas foram colocadas 50 µL da solução do extrato diluída em água destilada, variando a diluição de 1:1 até 1:512. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Foi considerada como CIM a menor concentração do extrato que inibiu completamente o crescimento bacteriano, observada pela presença do halo de inibição.

RESULTADO

Neste trabalho, todos os isolados de *S. aureus* ensaiados foram sensíveis ao extrato da *Lippia sidoides* Cham. A inibição do crescimento apresentou-se homogênea, de acordo com a concentração do extrato da planta em estudo.

A CIM observada pela formação dos halos de inibição ocorreu até a diluição de 1:16 variando de 9 a 27 mm de diâmetro. Dos 20 isolados de *S. aureus* testadas, 1 (5%) apresentou halos de inibição até a diluição de 1:16 (0,053 g mL⁻¹); 4 (20%) apresentaram halos de inibição até a diluição de 1:8 (0,107 g mL⁻¹); 6 (30%) apresentaram halos de inibição até a diluição de 1:4 (0,21 g mL⁻¹); 3 (15%) até a diluição de 1:2 (0,43 g mL⁻¹) e 6 (30%) apresentaram halo de inibição apenas com o extrato puro (0,86 g mL⁻¹).

Na Figura 1 observam-se os halos de inibição do extrato da *Lippia sidoides* Cham. sobre o isolado de *Staphylococcus aureus* 125H.



FIGURA 1. Atividade do extrato da *Lippia sidoides* Cham. sobre o isolado de *Staphylococcus aureus* 125H.

DISCUSSÃO

O uso abusivo e indiscriminado de antimicrobianos tem proporcionado o surgimento de resistência dos microrganismos aos fármacos de uso corrente e, como conseqüência, a necessidade de se pesquisar novos produtos que possam substituir aqueles que já não têm eficácia (Masurani & Tavares, 2007).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é considerada como um problema inerente à terapia antimicrobiana, por este motivo é preciso sempre buscar novas fontes terapêuticas. Testar produtos naturais pode ser uma medida alternativa importante para ajudar a resolver esse problema de resistência.

Neste estudo verificou-se a atividade antimicrobiana da *Lippia sidoides* Cham. (Alecrim-pimenta) sobre *S. aureus* de origem humana hospitalar, com resultados promissores em relação a esse extrato.

Nos últimos anos vários estudos estão sendo desenvolvidos para a determinação da atividade antimicrobiana de extratos de plantas, e uma grande variedade destes extratos demonstram potencial atividade sobre um extenso número de microrganismos. Dentre esses estudos o de Albuquerque (2007) relata que o extrato da *Lippia sidoides* Cham. possui efeito inibitório frente a diversos microrganismo como *Streptococcus mitis*, *S. sanguinis* e *S. mutans*, *S. sobrinus* e *Lactobacillus Casei* com formação de halos de inibição variando de 14 a 23 mm

Oliveira et al. (2006) avaliaram a atividade do óleo essencial da *Lippia sidoides* Cham. na inibição do crescimento de cepas de *Staphylococcus aureus* observando halos de inibição do crescimento bacteriano entre 15-21 mm.

Botelho et al. (2007) avaliaram a atividade antibacteriana e antifúngica do óleo essencial da *Lippia sidoides* Cham. sobre microrganismos da cavidade bucal e os resultados mostraram atividade antimicrobiana frente *Streptococcus mutans*, *S. mitis*, *S. salivaris*, *S. sanguis* e *Candida albicans*, com halos de inibição entre 8,5 e 34 mm.

Os produtos naturais são uma alternativa viável, uma vez que sempre foram importantes para o encontro de novas drogas. Atualmente um quarto da metade de todos os fármacos comercializados é originário de plantas, porém nenhum destes é utilizado como antimicrobiano, a grande maioria é usada como suplementos vitamínicos e dietéticos (Cowan, 1999).

Os resultados obtidos nas condições deste estudo mostram que o extrato da *Lippia sidoides* Cham. possui potencial antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*, o que pode permitir futuramente estudos de toxicidade *in vitro* e *in vivo*, bem como testes clínicos para posterior utilização como antimicrobiano.

REFERÊNCIA

- ALBUQUERQUE, A.C.L. **Efeito antimicrobiano dos extratos da *Matricaria recutia* Linn. e *Lippia sidoides* Cham. sobre microrganismos do biofilme dental.** 2007. 120p. Dissertação (Mestrado - Área de concentração em Diagnóstico Bucal) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- BOTELHO, M.A. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.40, n.3, p.349-56, 2007.
- BROOKS, G.F. et al. Os estafilococos. In: BROOKS, G.F.

- et al. **Microbiologia médica**. 21.ed. Salvador: Guanabara Koogan, 2000. p.157-62.
- CASSETTARI, V.C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E.A.S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? **Brazilian Journal Infection Disease**, v.9, n.1, p.70-6, 2005.
- COWAN, M.M. Plants products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Review**, v.12, n.4, p.564-82, 1999.
- HARVEY, J.; GILMOUR, A. Isolation and characterization of *Staphylococcus* from goats milk produced in Northern Ireland. **Letters In Applied Microbiology**, v.7, p.140-4, 2005.
- LACOSTE, E. et al. Antiseptic properties of essential oil of *Lippia sidoides* Cham.: application to the cutaneous microflora. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v.54, p.228-30, 1996.
- LEMOIS, T.L.G. et al. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants **Phytotherapy Research**, v.4, n.2, p.82-4, 1990.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512p.
- MARTINS, E.R. et al. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 2000. 220p.
- MATOS, F.J.A.; OLIVEIRA, F. *Lippia sidoides* Cham. farmacognosia, química e farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.79, p.84-7, 1998.
- MATOS, F.J.A. **Farmácia viva: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. 4.ed. Fortaleza: Editora UFC, 2002. 267p.
- MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil**. Fortaleza: UFC, 2000. 344p.
- MASURANI, A.; TAVARES, L.C. Estudos de QSAR-3D em derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos com atividade frente a *Staphylococcus aureus* multi-resistente. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.2, p.101-16, 2007.
- METAN, G.; ZARAKOLU, P.; UNAL, S. Rapid detection of antibacterial resistance in emerging Gram-positive cocci. **Hospitalar Infection Review**, v.61, p.93-9, 2005.
- NOVAIS, T.S. et al. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, supl., p.8-11, 2003.
- SANTOS, A.L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial**, v.43, n.6, p.413-23, 2007.
- OLIVEIRA, F.P. et al. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Review Brazilian Farmacognosy**, v.16, n.4, p.510-6, 2006.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. 827p.
- VANDENBERGH, M.F.Q.; VERBRUGH, H.A. Carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical relevance. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.133, p.525-34, 1999.