



AGROPECUÁRIA CIENTÍFICA NO SEMI-ÁRIDO ISSN 1808-6845

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA “*IN VITRO*” DA *Lippia sidoides* CHAM SOBRE *Staphylococcus aureus* DE ORIGEM BOVINA

Viviane Araújo da Silva

Estudantes de Graduação em Ciências Biológicas na Universidade Federal da Paraíba
E-mail: viviane.biologia@hotmail.com

Andréia Fernanda Ramos de Freitas

Estudantes de Graduação em Ciências Biológicas na Universidade Federal da Paraíba

Maria do Socorro Vieira Pereira

Professora do Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba

Andréia Vieira Pereira.

Estudante de Pós-graduação da UFCG- Campus Patos

RESUMO: *Staphylococcus aureus* apresenta-se como um microorganismo patogênico clássico sendo comumente reconhecido como agente etiológico de infecções hospitalares e comunitárias. Através do conhecimento das propriedades biológicas do Alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*, Cham), esta pesquisa teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana “*in vitro*” do óleo essencial desta planta em inibir o crescimento de cepas de *S. aureus* isoladas de secreções do úbere, fossas nasais e do leite. Os resultados mostraram destacável atividade anti-estafilocócicas *aureus* do extrato da *Lippia sidoides* Cham notadas por halos de inibição do crescimento bacteriano (11 a 26 mm). A concentração inibitória mínima (CIM) encontrada foi de 1:8 para todas as amostras estudadas. A CIM apresentou eficácia na inibição da viabilidade de *S. aureus* em caldo durante vinte e quatro horas de interação, caracterizando efeito bacteriostático. Esses resultados demonstram a atividade anti-estafilocócicas do extrato de *Lippia sidoides*, bem como, suportam a possibilidade de seu uso como agente antimicrobiano.

Palavras chaves: Alecrim-pimenta; Atividade antibacteriana; Infecção nosocomial; *Lippia sidoides* Cham; Microorganismo resistente; *Staphylococcus aureus*.

EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY “*IN VITRO*” OF *LIPPIA SIDOIDES* CHAM ON *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* FROM ORIGIN BOVINE

ABSTRACT: *Staphylococcus aureus* is a classic pathogen microorganism and it is commonly recognized as etiological agent of many community and nosocomial infections. Regarding the knowledge about the biological properties of Alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham), this study aimed to evaluate the antimicrobial activity “*in vitro*” of its essential oil of this plant in inhibiting the growth of *S.aureus* strains isolated from udder secretion, nasal pit and milk. The results showed prominent anti-*Staphylococcus aureus* activity of *Lippia sidoides* Cham essential oil noted by large growth inhibition zones (11 a 26 mm). Minimum Inhibitory Concentration found was 1:8 for all sample rehearsed. MIC presented prominent effectiveness in inhibiting the viability of *S. aureus* in broth during twenty-four hours of exposure characterizing a bacteriostatic effect. These results show the promising anti-staphylococcal property of *L. sidoides* essential oil and support the possibility of its rational use as alternative antibacterial agent.

Key-words: Alecrim-pimenta; Activity antimicrobial; Infection nosocomial; *Lippia sidoides*, Cham; microorganism resistance; *Staphylococcus aureus*.

INTRODUÇÃO

Staphylococcus é um gênero de bactérias da família Micrococcaceae que se apresenta sob forma de cocos Gram-positivos, com catalase-positivo, de diâmetro médio entre 0,5 e 1,5µm, imóveis, não esporulado e geralmente não-capsulado. Essa bactéria pode apresentar-se em diversas formas, que vão desde isolados, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupados irregularmente com aspecto semelhante a cachos de uva. (HARVEY et al., 1988; TORTORA et al., 2003; CASSETARI, 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 o *Staphylococcus aureus*, assim denominado em decorrência da pigmentação amarelada de suas colônias, onde aureus significa dourado (SANTOS et al., 2007).

Staphylococcus aureus pode provocar doenças que vão desde uma simples infecção (espinhas e furúnculos) até infecções mais graves (pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia e outras (SANTOS et al., 2007).

Embora possa ser causada por inúmeros microrganismos como bactérias gram-positivas e gram-negativas, além de vários tipos de fungos, os *Staphylococcus aureus* são reconhecidos como agente etiológicos mais observados nos casos de mastite bovina em vários países do mundo (SÁ et al., 2004). Algumas características de virulência que contribuem para a persistência dos *S. aureus* no tecido mamário e o uso inadequado de antibióticos que propicia o aparecimento de cepas multirresistentes, são fatores que comprometem a eficiência do tratamento de mastite bovina causada por este microrganismo (BARBEIRO et al., 2002).

A mastite bovina é atualmente um dos principais problemas que comprometem o gado e que trás sérios problemas para a pecuária leiteira tendo em vista os graves prejuízos acarretados, quer seja pela diminuição da produção de leite quer seja pela perda dos rebanhos afetados. A elevada ocorrência dos casos de mastite bovina e as perdas econômicas decorrente principalmente da diminuição da produção láctea fazem com que esta enfermidade seja considerada a mais dispendiosa nas propriedades leiteiras (ANDRADE et al., 2000).

A grande patogenicidade destas amostras multirresistentes se deve a presença de fatores de virulência presentes na parede celular como a cápsula, peptidoglicano, ácidos teicóicos, proteína A, adesinas e síntese de enzimas e toxinas extracelulares (NOSTRO et al., 2004). Outros potenciais fatores de virulência, já descritos em *S.aureus*, incluem proteínas de membrana que promovem a aderência ao tecido danificado, e proteínas que ajudam a evitar respostas imunes mediadas por anticorpos (FOSTER, 2004).

Espécies de *Staphylococcus* spp resistentes a antimicrobianos representam um problema cosmopolita, sendo o controle de sua disseminação um importante desafio. Nos últimos anos, a resistência de microrganismos patogênicos a múltiplas drogas tem aumentado devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, comumente usados no tratamento de doenças infecciosas. Essa situação vem

despertando o interesse dos cientistas na busca de novas drogas.

Os vegetais são uma excelente fonte de busca de 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., planta da família Verbenaceae popularmente conhecida como alecrim-pimenta, é um arbusto nativo da Caatinga, região do Nordeste do Brasil, que apresenta área de maior ocorrência na faixa compreendida entre os Estados da Bahia e do Ceará. Do alecrim-pimenta, é extraído o óleo essencial, que é rico timol e carvacrol o que lhe confere fortíssima atividade antimicrobiana e anti-séptica (MACAMBIRA et al., 1986).

As folhas da *Lippia sidoides* Cham. são geralmente utilizadas para tratamento de acne, ferimentos, infecções da pele e do couro cabeludo. Sua infusão tem sido usada popularmente em inalações, rinite alérgica e no tratamento das infecções vaginais, da boca e da garganta (MATOS; OLIVEIRA, 1998)

Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides* Cham sobre amostras de *S.aureus* isolados de bovinos em fase de lactação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Linhagens Bacterianas

Foram utilizadas 20 amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas da secreção do úbere, fossas nasais e do leite. As amostras animais foram isoladas de bovinos em fase de lactação no Município de Patos, Região do Semi-árido Paraibano.

Material Botânico

A matéria prima (folhas) da *Lippia sidoides* Cham., no início da floração, foram coletadas no Horto de plantas medicinais do Laboratório de Tecnologia Farmacêuticas (LTF) da Universidade Federal da Paraíba e foram secas em estufa a 40°C.

Obtenção do Extrato

A obtenção do extrato da planta foi realizada no Laboratório de Tecnologia Farmacêuticas do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco.

Para a extração do extrato foi empregado o método de lixiviação (Modelo Ika-Werk), em fluxo contínuo à temperatura ambiente. A extração ocorreu através da solução extrator de álcool metanol (a 80% v/v) renovado constantemente por um período de 24 horas, pelo qual se obteve um concentrado a 500 ml.

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

A atividade antimicrobiana em placas de Petri do extrato da *Lippia sidoides* Cham foi determinada pelo método de difusão em meio sólido para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) sobre as linhagens bacterianas.

As linhagens foram cultivadas em caldo nutritivo (BHI – Brain Heart Infusion-DIFCO); incubadas a 37°C por um período de 18-24 horas. Foram realizadas diluições de 10⁻² do crescimento bacteriano em caldo nutritivo e estas foram inoculadas em meio de cultura (Agar Mueller Hinton – DIFCO) por inundação.

Foram realizadas perfurações no meio de cultura de aproximadamente 6 mm de diâmetro. Nas perfurações foram colocados um volume de 50µl da solução do extrato diluída em água destilada, variando a diluição de 1:1 até 1:1024. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por

um período de 24 horas. Foi considerada como CIM a menor concentração do extrato que inibiu completamente o crescimento bacteriano, observada pela presença do halo de inibição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides* Cham sobre as amostras da *S. aureus* de origem bovina foi conduzida avaliando-se a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), a qual é analisada de acordo com diâmetro dos halos de inibição formados sobre as amostras. Através da Tabela 1 podem-se observar os resultados obtidos nos experimentos. A Figura 1 apresenta uma fotografia da ação antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides* Cham sobre a linhagem 212 U.

Tabela 1- Concentração inibitória mínima do extrato da *Lippia sidoides* Cham. sobre 20 amostras de *S.aureus* de origem bovina

Linhagens Bacterianas	Diâmetro do halos de inibição (mm)									
	Concentração do Extrato (mg/ml)									
E.P	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:1024	
250 U	21	00	00	00	00	00	00	00	00	00
324 U	16	15	00	00	00	00	00	00	00	00
314 FN	16	15	12	00	00	00	00	00	00	00
303 U	24	19	14	12	00	00	00	00	00	00
311 FN	23	20	00	00	00	00	00	00	00	00
146 L	26	17	13	00	00	00	00	00	00	00
313 FN	25	20	15	00	00	00	00	00	00	00
429 FN	25	23	14	11	00	00	00	00	00	00
319 U	17	14	00	00	00	00	00	00	00	00
319 L	25	19	15	00	00	00	00	00	00	00
322 FN	20	16	13	00	00	00	00	00	00	00
312 U	19	14	00	00	00	00	00	00	00	00
316 U	15	12	00	00	00	00	00	00	00	00
249 FN	19	13	00	00	00	00	00	00	00	00
212 U	25	18	14	13	00	00	00	00	00	00
122 U	23	14	13	12	00	00	00	00	00	00
129 FN	19	15	13	00	00	00	00	00	00	00
313 U	16	13	12	00	00	00	00	00	00	00
311 L	22	16	14	11	00	00	00	00	00	00
302 U	16	14	12	11	00	00	00	00	00	00

Onde: E.P- Extrato puro; U- Úbere; FN- Fossa nasal; L- Leite;



Figura 1- Concentração Inibitória Mínima do extrato da *Lippia sidoides* Cham. sobre *Staphylococcus aureus* de origem bovina – 212 U.

Os resultados mostraram a atividade antiestafilococás do extrato de *Lippia sidoides* Cham em todas as linhagens ensaiadas (Tabela 1). Observaram-se halos de inibição variando de 26 a 11 mm de diâmetros nas linhagens testadas; sendo considerado ativo o extrato que mostrou halos de inibição superior a 12 mm de diâmetro. A inibição do crescimento mostrou-se homogênea de acordo com o grau de concentração do extrato da planta em estudo.

Das 20 amostras de *S. aureus* ensaiadas, 6 (30%) apresentaram halos de inibição até a diluição de 1:8; 7 (35%) apresentaram diluição até 1:4; 6 (30%) apresentaram halos de inibição até a diluição de 1:2 e apenas 1 amostra (5%) apresentou halo de inibição apenas com o extrato puro.

Estudo avaliou a efetividade do óleo essencial da *Lippia sidoides* Cham. na inibição do crescimento de cepas de *Staphylococcus aureus* com diferentes perfis de resistência antibiótica isoladas de material clínico. Os resultados mostraram destacável atividade antimicrobiana do óleo essencial da *Lippia sidoides* notada por grandes halos de inibição do crescimento bacteriano (15-21 mm) suportando a possibilidade de seu uso racional como agente antimicrobiano alternativo (OLIVEIRA et al., 2006).

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que o extrato da *Lippia sidoides* Cham possui um grande potencial antimicrobiano contra os *Staphylococcus aureus*, o

que permite que o uso dessa planta seja futuramente, baseado em estudos de toxicidade *in vitro*, uma medida alternativa para tratar enfermidades causadas por esses microrganismos.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, M.A.; DIAS FILHO, F.C.; MESQUISTA, A.J.; ROCHA, P.T. Sensibilidade “in vitro” de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica. *Ciência Animal Brasileira*, v.1, n.1, p.53-57, 2000.

BARBERIO, A.; GIETL, H.; DALVIT, P. “In vitro” sensibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* e coliformes isolados de mastite bovina na região de Veneto, Itália, no período de 1996-1999. *Napgama*, v.5, n.1, p.10, 2002.

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.

- FOSTER, T. J.; MÉDAILLE, C.; ETORÉ, F. *In Vitro* antimicrobial activity of orbifloxacin against *Staphylococcus aureus intermedius* isolates from canine skin and ear infection. *Research in Veterinary Science*, v.77, p. 67-71. 2004.
- HARVEY, J.; GILMOUR, A. Isolation and characterization of *Staphylococcus* from goats like produced in Northern Ireland. *Letters In Applied Microbiology*, v.7, p.140-144. 2005.
- MACAMBIRA, L. M. A.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; CRAVEIRO, A. A. Naphtoquinoids from *Lippia sidoides*. *Journal of Natural Products*, v.49, p. 310-312, 1986
- MATOS, F.J.A.; OLIVEIRA, F. *Lippia sidoides* Cham.– Farmacognosia, química e farmacologia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 79, p. 84-87, 1998.
- NOSTRO A.; BLANCO, A.R.; CANATELLI, M.A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; ROCCARO, S.; ALONZO, V. *FEMS Microbiology letter* 230:191-195, 2004.
- NOVAIS, T.S. COSTA, J.F.O.; DAVID, J.P.L.; DAVID, J.M.; QUEIROZ, L.P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A.M.; SOARES, M.B.P.; SANTOS, R.R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, João Pessoa, v.14, supl., p.08-11, 2003.
- OLIVEIRA, F. P.; LIMA, E.O.; SIQUEIRA JÚNIO, J.P.; SOUZA, E.L.; SANTOS, B.H.C.; BARRETO, H.M. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. *Review Brazilian Farmacognosy*, João Pessoa, v.16. n.4, p.510-516, Out/Dez 2006
- SÁ, M.E.P.; CUNHA, M.S.R.S.; E LIAS, A.O.; VICTORIA, C.; LANGONI, H. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science*, v.41, n.5, p.321-326, 2004.
- SANTOS, A.L; SANTOS, O.D; FREITAS, C.C; FERREIRA, B.A.L; AFONSO, I.L; RODRIGUES, C.R; CASTRO, H.C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial*. v.43, n.6, p.413-423, dezembro 2007.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 6. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.