

Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) e de seu composto ativo nerolidol em combinação ao EDTA ou lisozima

Jane Mary Lafayette Neves Gelinski*

Juliana Carla Dalla Rosa**

Elisângela de Fátima Aparecida Paravisi Duquesne***

Cesar Milton Baratto****

Resumo

Os óleos essenciais de plantas são considerados fontes de substâncias biologicamente ativas. A Família Asteraceae tem sido amplamente estudada quanto à composição química e atividade biológica. No gênero *Baccharis*, os compostos mais estudados são os flavonoides e os terpenoides. *Baccharis dracunculifolia* DC. é nativa do cerrado brasileiro e considerada a principal fonte botânica da própolis verde. Os objetivos deste estudo foram avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas e flores de *B. dracunculifolia* e seu composto ativo, o nerolidol, de forma pura ou combinada ao EDTA ou à lisozima a cepas de bactérias patogênicas Gram positivas e Gram negativas. Foram utilizadas as técnicas de difusão em ágar e difusão em discos de papel filtro para avaliar a atividade antibacteriana das substâncias: óleo essencial de *B. dracunculifolia* (Ole30), nerolidol puro ou combinado ao EDTA ou a lisozima, e os antibióticos usados como controles: gentamicina, tetraciclina, estreptomicina, oxacilina, cloranfenicol, vancomicina, penicilina, amoxicilina, rifampicina e eritromicina. As bactérias mais sensíveis ao Ole30 foram: *Proteus* sp., *Staphylococcus* sp., *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. No teste de difusão em poços, o Ole30 e o cloranfenicol inibiram *Proteus* sp., *Staphylococcus* sp. e *L. monocytogenes*, mas *Salmonella enterica* subesp. *enterica* Typhimurium e *S. Panama* foram resistentes ao Ole30. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mostrou-se resistente ao Ole30 em ambas as técnicas utilizadas. O nerolidol puro inibiu *Staphylococcus* sp. e *L. monocytogenes*, e na forma combinada ao EDTA inibiu *Proteus* sp., em combinação à lisozima inibiu *S. aureus* ATCC 25923 e *L. monocytogenes*.

Palavras-chave: Antibacteriana. Óleo essencial. Difusão em ágar. Nerolidol.

* Doutora em Ciência dos Alimentos; professora da Área de Ciências Exatas e da Terra da Universidade do Oeste de Santa Catarina – Núcleo Biotecnológico, Bloco K, Laboratório de Microbiologia de Alimentos; Rua Paese, 198 Bairro Universitário, 89560-000, Videira, SC; jgelinski@yahoo.com.br

** Bacharel em Farmácia pela Universidade do Oeste de Santa Catarina; jufarmavda@yahoo.com.br

*** Bacharel em Farmácia pela Universidade do Oeste de Santa Catarina.

**** Doutor em Biologia Molecular; professor da Área de Ciências Exatas e da Terra da Universidade do Oeste de Santa Catarina – Núcleo Biotecnológico, Bloco K, Laboratório de Microbiologia de Alimentos; cmbaratto@yahoo.com.br

1 INTRODUÇÃO

Plantas medicinais contêm princípios fisiologicamente ativos que vêm sendo explorados na medicina tradicional para tratamento de várias doenças em razão do fato de conterem propriedades antimicrobianas. Essa prática mundial deve-se, principalmente, ao baixo custo, fácil acesso e experiência vivida pelos antepassados.

De acordo com Verdi, Brighenti e Pizzolatti (2005), o gênero *Baccharis* está representado por mais de 500 espécies. Conhecido como alecrim-do-campo, vassourinha-do-campo ou alecrim-de-vassoura, trata-se de um arbusto lenhoso, de crescimento rápido, medindo entre 0,5 e 4,0 m de altura, ocorrendo da Região Sudeste à Região Sul do Brasil. É considerada uma espécie invasora de campos e pastagens abandonadas, adaptando-se facilmente a solos ácidos e pobres em nutrientes (LEITÃO, 2005). A espécie *Baccharis Dracunculifolia* DC. (Família Asteraceae) é nativa do cerrado brasileiro, sendo a principal fonte botânica da própolis verde (FIGUEIREDO, 2006).

Plantas da Família Asteraceae têm sido amplamente estudadas quanto à sua composição química e atividade biológica; algumas têm proporcionado o desenvolvimento de novos fármacos e inseticidas, entre outros (ZOMLEFER, 1994). No gênero *Baccharis* os compostos mais estudados são os flavonoides e os terpenoides. Quanto às atividades biológicas destacam-se os efeitos alelopáticos, citotóxicos, anti-inflamatórios e antimicrobianos (FAINI; CASTILLO; TORRES, 1982; JARVIS et al., 1991).

A avaliação de substâncias antimicrobianas presentes em plantas pode ser realizada por intermédio de testes de inibição do crescimento de micro-organismos, colocados em contato com tecidos ou extratos dessas plantas. Os testes se diferenciam no que se refere à sensibilidade ou aos seus princípios. Os resultados obtidos podem sofrer influência do método escolhido e dos micro-organismos utilizados como indicadores de atividade antimicrobiana. A parte das plantas utilizada também tem papel fundamental, bem como a forma de uso: suco, extrato (extração por água ou outros solventes) ou óleo essencial (SOUZA et al., 2000).

Os óleos essenciais obtidos de plantas são fontes em potencial de substâncias biologicamente ativas. As propriedades mais estudadas são as antimicrobianas, antitumorais e inseticidas (KELSEY, REYNOLDS; RODRIGUEZ, 1984). Os óleos essenciais são obtidos por meio de destilação por arraste com vapor de água. De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas, de aparência oleosa em temperatura ambiente, por isso a designação de óleo. O aroma agradável e intenso da maioria dos óleos voláteis é uma característica importante e, portanto, também chamados de essências (HUFF, 1999).

Carrera (2007) afirma que as propriedades antifúngica, antibacteriana e inseticida dos óleos voláteis estão entre as mais testadas. E, ainda, as plantas do gênero *Baccharis* representam um vasto campo de estudos para novos compostos ativos extraídos dos óleos voláteis que contêm e suas interações com o ambiente.

O óleo essencial da *B. dracunculifolia* tem como componente majoritário um sesquiterpeno denominado nerolidol (QUEIROGA, 1989). Estudos sobre esse composto indicam seu efeito inibidor do crescimento do *Plasmodium falciparum*, o agente causador da malária (MACEDO et al., 2002) e de *Leishmania amazonensis*, causador da leishmaniose tegumentar americana (ARRUDA; D'ALEXANDRI; ULIANA, 2005). O nerolidol (Imagem 1) é um sesquiterpeno presente nos óleos essenciais de diversas plantas e foi aprovado nos Estados Unidos da América pela agência reguladora *Food and Drug Administration* (FDA) como um agente flavorizante utilizado em alimentos (ARRUDA; D'ALEXANDRI; ULIANA, 2005). Segundo Wattenberg (1991 apud ARRUDA; D'ALEXANDRI; ULIANA, 2005) esse composto também apresenta propriedade antineoplásica.

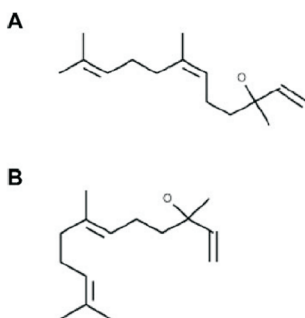


Imagem 1: Estrutura química do nerolidol. (A) cis-3,7,11-trimetil-1,6,10 dodecatrien-3-ol e (B) trans-3,7,11-trimetil-1,6,10-dodecatrien-3-ol

Fonte: Arruda, D'Alexandri e Uliana (2005).

O Nerolidol é encontrado no óleo essencial da planta *B. dracunculifolia* (QUEIROGA, 1989) e representa um composto de grande interesse da indústria de perfumes em virtude de ser um fixador natural, fundamental na composição dos perfumes (FRIZZO, 2000).

Várias espécies apresentam esse composto, como *Myrocarpus frondosus* (óleo de cabreúva), *Myroxylon pereirae* (bálsamo do Peru), *Myrospermum erythroxyton* (óleo vermelho) e o óleo da madeira da espécie *Fokienia hodginsii*. O nerolidol existe como dois isômeros geométricos, um trans (chamado nerolidol "a" ou (E)-nerolidol) e uma forma cis (nerolidol "b" ou (Z)-nerolidol). Em vegetais, predomina a forma "a" (QUEIROGA, 1989). O nerolidol foi isolado de *B. dracunculifolia* primeiramente por Motl e Trka (1983 apud QUEIROGA, 1989), perfazendo 14% do óleo total, sendo este um dos compostos majoritários dessa espécie.

Estudos fitoquímicos de espécimes de *Baccharis* destacam-se na ocorrência de flavonoides, diterpenos e triterpenos, observando-se maior acúmulo de flavonas, flavonoides, diterpenos labdanos e clerodanos (VERDI; BRIGHENTI; PIZZOLATTI, 2005).

Paulinelli et al. (2004) analisaram os óleos voláteis em dois espécimes de *B. dracunculifolia* e verificaram que os principais componentes são terpenóides. No primeiro espécimen analisado houve predominância do sesquiterpeno oxigenado, o espatulenol, enquanto no outro espécimen predominou o nerolidol entre os sesquiterpenos oxigenados. Segundo Figueiredo (2006), *B. dracunculifolia* é a principal fonte botânica da própolis verde, sendo esta mais uma evidência de constituintes antibióticos na planta.

A verificação da ação do extrato de óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia*, bem como do composto nerolidol contra patógenos de importância a saúde humana pode ser bastante útil seja na produção de fármacos, seja na produção de alimentícios, por exemplo.

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas e flores de *Baccharis dracunculifolia* e seu composto ativo, o nerolidol, de forma isolada ou combinada ao etilenodiaminotetracético-EDTA ou à lisozima ante a bactérias patogênicas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *B. dracunculifolia* e de seu composto ativo, o nerolidol (EC 230597-5 Sigma Aldrich, Alemanha), foram utilizadas as técnicas de difusão em ágar (HARRIS; DAESCHEL; KLAENHAMMER, 1989) e difusão em disco de papel filtro (4 mm) im-

pregnado com a substância. O óleo essencial e o nerolidol foram utilizados isolados ou em combinação ao ácido etilenodiaminotetracético-EDTA (E8008, Sigma-Aldrich, Alemanha) ou à enzima lisozima (EC 3.2.1.17, Sigma-Aldrich, Alemanha).

2.1 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *B. DRACUNCULIFOLIA*

Folhas e flores da planta *B. dracunculifolia* foram colhidas nas primeiras horas do dia, nos meses de abril a setembro, no município de Videira, SC, nas proximidades do *Campus* da Universidade do Oeste de Santa Catarina, onde se apresenta uma vegetação natural, distante de possíveis contaminações por químicos agrícolas. A extração do óleo essencial foi realizada por hidrodestilação das partes aéreas utilizando aparelho Clevenger em um período de 6-7 horas. O óleo extraído foi fracionado em alíquotas de 1 mL, acondicionadas em frascos de vidro estéreis, envoltos com papel alumínio e armazenados a 0 °C.

2.2 PREPARO E ATIVAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS

Segundo Souza et al. (2000), na avaliação de atividade de antibacterianos, deve ser utilizada ao menos uma espécie de micro-organismo Gram-positivo e uma de Gram-negativo como indicador de atividade antimicrobiana. No presente trabalho, como micro-organismos indicadores Gram-positivos foram utilizadas as cepas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus* sp. (isolado de alimento) e *Listeria monocytogenes* (isolado de alimento) e como micro-organismos indicadores Gram-negativos foram utilizados: *Proteus* sp., *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium (*S. Typhimurium*) e *S. Panama* (isolados de alimentos e pertencentes ao banco de cepas do laboratório de microbiologia da Unoesc). As amostras bacterianas foram mantidas nos ágar: Ágar tríptico de soja-TSA acrescido de 0,6% de extrato de levedura (TSAYE), para *L. monocytogenes*, Ágar CLED para *Proteus* sp.; Ágar Baird Parker-BP, para *S. aureus* ATCC 25923, Ágar Eosina Azul de Metileno-EMB para *E. coli*, Ágar SS para *S. Typhimurium* e *S. Panama* e Ágar *Staphylococcus* para *Staphylococcus* sp. Para cada experimento foram realizados cultivos dos micro-organismos durante 18-20 horas de incubação a 37 °C em Caldo Brain Heart Infusion-BHI, exceto para *L. monocytogenes*, o qual foi utilizado caldo tríptico de soja acrescido de 0,6% de extrato de levedura (TSBYE), com incubação por 18-24 horas a 30 °C. Quanto à realização dos testes de antibiose com difusão de discos e difusão em poços, utilizou-se o Ágar TSAYE para *L. monocytogenes* e Ágar BHI para as demais bactérias. Todos os meios de cultura utilizados foram obtidos comercialmente (HiMedia Laboratories, Índia).

2.3 PREPARAÇÃO DOS DISCOS IMPREGNADOS COM ÓLEO ESSENCIAL, NEROLIDOL OU COM ANTIBIÓTICOS

Discos estéreis de papel filtro (Newprov, Brasil) com 6 mm de diâmetro foram impregnados com 30 µL de óleo essencial de *B. dracunculifolia* (Ole30) ou 30 µL de nerolidol isolado ou em combinação ao EDTA ou lisozima e utilizados em todos os testes por difusão em discos. Os antibióticos foram obtidos comercialmente (Laborclin, Brasil) e a concentração de cada disco em microgramas corresponde aos números

ao lado de cada sigla: gentamicina (Gen10), tetraciclina (Tet30), estreptomicina (Est10), oxacilina (Oxa1), cloranfenicol (Clo30), vancomicina (Van30), penicilina (Pen10), amoxicilina (Amo10), rifampicina (Rif5), eritromicina (Eri15). Nos testes de difusão em poços foram utilizados antibióticos na forma líquida com concentração igual aos discos contendo antibióticos obtidos comercialmente para testes de antibiogramas.

2.4 PREPARAÇÃO DOS CONTROLES E SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS EM ASSOCIAÇÃO AO NEROLIDOL

EDTA – inicialmente foi preparada uma solução concentrada de ácido etileno diamino tetra acético-EDTA a 10 mM. Posteriormente, essa solução de 10 mM foi esterilizada em autoclave por 12 minutos a 121 °C e armazenada em geladeira até sua utilização. O EDTA atua como agente quelante de íons metálicos na membrana externa de bactérias Gram negativas.

Nerolidol: concentração de 97%.

EDTA associado ao Nerolidol 1/10 (v/v): Para as bactérias Gram negativas foi utilizado o EDTA associado ao nerolidol em uma concentração final de 1 mM de EDTA. Foram usados 30 µL por poço.

Lisozima – foram utilizados 30 µL de uma solução de lisozima (0,33 µg/µL) diluída em água destilada estéril para uma concentração final de 10 µg. Essa enzima (muramidase) atua por hidrólise das ligações glicosídicas principalmente da parede celular de bactérias Gram positivas.

Lisozima associada ao nerolidol – para as bactérias Gram positivas (*Listeria monocytogenes* e *S. aureus* ATCC 25923) utilizou-se a combinação de lisozima (3,33 µg/µL) com nerolidol na concentração 1/10 (v/v).

Controle positivo – como controles positivos nos testes de difusão em poços foram utilizados em diferentes poços sobre o ágar soluções de penicilina, rifampicina, eritromicina, amoxicilina, cloranfenicol nas mesmas concentrações dos antibióticos impregnados em discos.

Controle negativo – para o controle negativo foram utilizados 30 µL de água destilada estéril.

2.5 TESTES DE ANTIBIOSE

Dois testes foram utilizados para avaliação da atividade antimicrobiana: teste de difusão em disco e teste de difusão em poços.

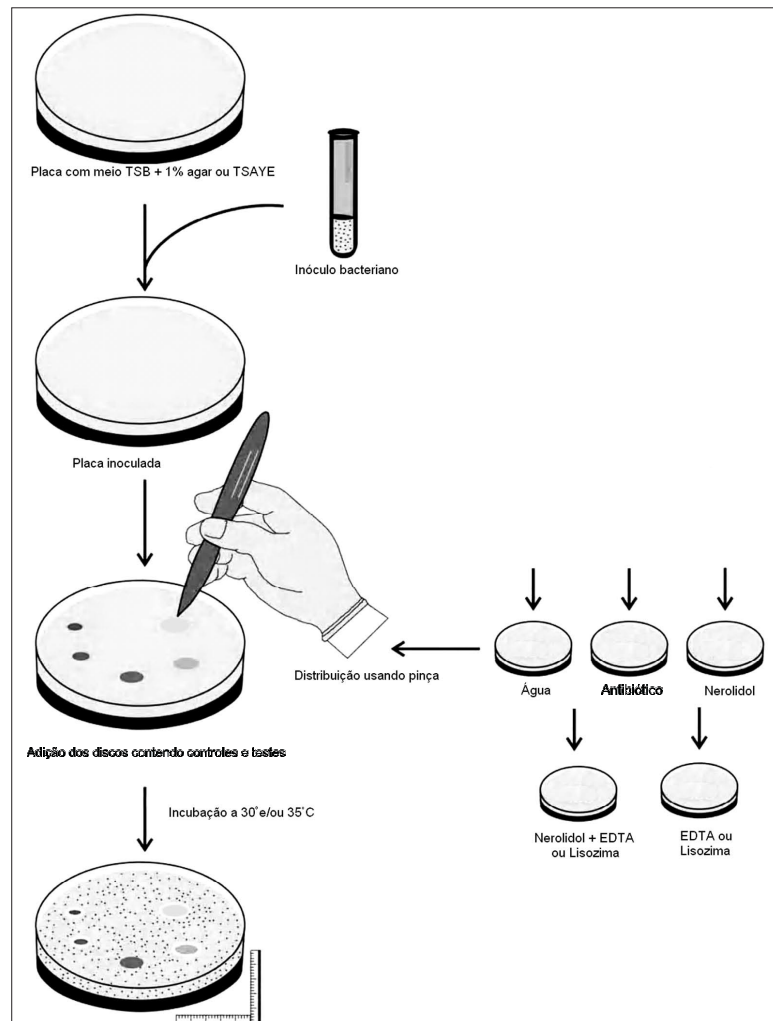
2.5.1 Teste de difusão em discos

Teste de difusão em disco usando óleo essencial de *B. dracunculifolia* e antibióticos. Inicialmente, foi realizada a preparação dos micro-organismos indicadores de atividade antimicrobiana: três a quatro colônias de cada micro-organismo utilizado nos testes foram retirados de culturas de micro-organismos indicadores, previamente crescidas em seus respectivos ágar por 24 horas e inoculadas em caldo BHI por 18-24 horas. Em seguida, 20 µL de cada suspensão foram postos em placas de petri semeadas com Ágar TSA 1% (contendo apenas 1% de ágar-ágar) ou TSBYE 1% (Ágar TSBYE acrescido de 1% de ágar-ágar) para *L. monocytogenes* e espalhados com o auxílio de uma alça de Drigalski. Após 3-5 minutos, um disco de cada antibiótico foi posto sobre o ágar com o auxílio de uma pinça estéril.

Teste de difusão em discos usando o nerolidol puro, associado ao EDTA ou à lisozima. O procedimento foi o mesmo descrito anteriormente, com algumas modificações: 30 µL de cada substância (nerolidol puro, EDTA isolado, EDTA associado ao nerolidol (1/10)); nerolidol associado à lisozima (1/10) e lisozima pura (10 µg) foram impregnados nos discos de papel filtro estéreis. Cada disco foi aplicado sobre o meio de cultura já inoculado com o micro-organismo teste. A incubação foi realizada a 30 °C ou a 35 °C, conforme o micro-organismo testado (Esquema 1). Nesses testes foram utilizados como micro-organismos indicadores Gram negativos: *Escherichia coli*, *Proteus* sp. e *Salmonella* Typhimurium e *S. Panama* e como Gram positivos: *L. monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

A leitura de cada teste de antibiose foi realizada com o auxílio de uma régua milimetrada, usando-se a medida do tamanho do diâmetro dos halos de inibição em volta de cada disco, por meio do fundo da placa, com iluminação contra um fundo escuro, sendo incluído na medição o próprio disco de 6 mm de diâmetro. Os resultados foram organizados em tabelas. Os valores obtidos foram comparados aos de uma tabela padrão, onde estão relacionados os tamanhos dos halos que significam sensibilidade ou resistência às drogas.

Todos os procedimentos para os testes de difusão em ágar foram baseados no manual do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), antigo NCCLS (2003 apud BRASIL, 2003).



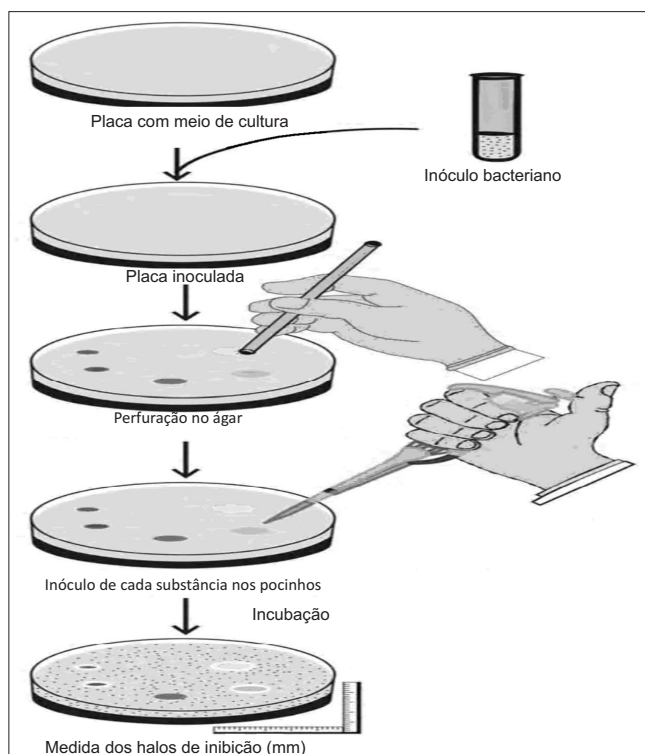
Esquema 1: Teste de difusão em disco para avaliação da ação antimicrobiana usando nerolidol puro, nerolidol associado ao EDTA ou nerolidol associado à lisozima

2.5.2 Teste de difusão em poços

Teste de difusão em poços usando óleo essencial de *B. dracunculifolia* e antibióticos. Culturas de cada micro-organismo indicador foram postas em caldo BHI para multiplicação por 18-24 horas a 35 °C, exceto para a *Listeria monocitogenes*, para a qual foi utilizado o caldo TSB acrescido de extrato de levedura a 0,6%YE, com incubação a 30° C. Nos experimentos procedeu-se colocando 20 µL da cultura contendo o micro-organismo teste nas placas de Petri estéreis. Sobre esse inóculo foi acrescentado 20 mL de Ágar TSB 1% ou TSBYE com 1% ágar homogeneizando esse sistema. Depois de solidificado, foram perfurados poços de 4 mm sobre o ágar, onde foram inoculadas, em diferentes poços, soluções preparadas de água destilada estéril contendo 10 µg de penicilina, 5 µg de rifampicina, 15 µg de eritromicina, 10 µg de amoxicilina e 30 µg de cloranfenicol e 30 µl de óleo essencial.

Teste de difusão em poços usando o nerolidol puro, associado ao EDTA ou à lisozima. Foi utilizado nerolidol puro, EDTA associado ao nerolidol (1/10) para bactérias Gram negativas e lisozima associada ao nerolidol (1/10) para Gram positivas; controles: positivo (ampicilina 10 µg) e controle negativo (30 µL de água destilada estéril). Tanto o nerolidol quanto EDTA e a lisozima também foram usados isoladamente. Os cultivos foram realizados com 18 a 24 horas de incubação a 37 °C, exceto para *L. monocytogenes*, a qual foi incubada a 30 °C. Todos os testes foram realizados em duplicatas com 3 repetições.

A medida dos halos (mm), incluindo o diâmetro do poço, foi obtida usando uma régua milimetrada e verificando que, quanto maior o halo de inibição, mais eficaz a substância frente ao micro-organismo utilizado nos testes. Foram registradas as médias dos diâmetros dos halos de inibição e os respectivos desvios padrões. O Esquema 2 apresenta os principais passos da técnica de difusão em poços.



Esquema 2: Técnica de difusão em poços para avaliação de atividade antimicrobiana

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração do óleo essencial do alecrim-do-campo ocorreu nos meses de abril e maio, agosto e setembro. Nos meses de abril e maio não houve bom rendimento, com apenas 0,11 mL de óleo essencial para 113,3 g de planta utilizada. Já nos meses de agosto e setembro as extrações foram mais significativas, sendo 2,6 g de óleo essencial para a mesma quantidade de planta utilizada.

O óleo essencial obtido neste estudo demonstrou poder inibitório diante de algumas bactérias patogênicas.

A Tabela 1 apresenta as médias das medidas dos diâmetros dos halos de inibição, do óleo essencial e de alguns antibióticos utilizados ante as bactérias patogênicas testadas na metodologia de difusão em discos de papel.

Tabela 1: Resultados do teste de difusão de discos com extrato de óleo essencial de *Baccharis drunculifolia* (Ole30) e antibióticos como controles

| | MICRO-ORGANISMOS | ANTIBIÓTICOS (em µg) | | | | | | | | | | OLE30* |
|---|-------------------|----------------------|-----|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|--------|
| | | Gen | Tet | Est | Oxa | Clo | Van | Pen | Amo | Rif | Eri | |
| | | 10 | 30 | 10 | 1 | 30 | 30 | 10 | 10 | 5 | 15 | |
| | Halos (mm) | | | | | | | | | | | |
| <i>Proteus sp.</i> | média | 13 | 0 | 13 | 0 | 12 | 0 | 0 | 6 | 4 | 5 | 18 |
| | DP* | 2.5 | 0 | 2.5 | 0 | 6.7 | 0 | 0 | 2.5 | 4 | 5.5 | 8,4 |
| <i>Staphylococcus sp.</i> | média | 19 | 11 | 14 | 17 | 27 | 16 | 16 | 20 | 20 | 21 | 19,2 |
| | DP | 1.03 | 0.8 | 2.7 | 3 | 4 | 2 | 2 | 2.6 | 1.7 | 1.8 | 1,4 |
| <i>Escherichia coli</i> | média | 4 | 0 | 3 | 0 | 15 | 0 | 5 | 8 | 6 | 9 | 12 |
| | DP | 4.3 | 0 | 3.7 | 0 | 7.6 | 0 | 6.1 | 8.8 | 7.4 | 7.7 | 1.8 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | média | 15 | 13 | 11 | 15 | 21 | 12 | 6 | 0 | 9 | 6 | 15,6 |
| | DP | 7.3 | 3.6 | 7.2 | 7.2 | 0.98 | 5.1 | 4.8 | 0 | 9.3 | 5 | 5,4 |
| <i>Salmonella Typhimurium</i> | média | 3 | 0 | 0 | 7 | 20 | 3 | 5 | 10 | 2 | 5 | 3,6 |
| | DP | 4.4 | 0 | 0 | 7.4 | 1.09 | 3.4 | 6 | 11.8 | 3 | 9 | 5 |
| <i>Salmonella Panama</i> | média | 11 | 16 | 0 | 0 | 28 | 4 | 2 | 0 | 3 | 0 | 6 |
| | DP | 6 | 8 | 0 | 0 | 1.3 | 4 | 4.8 | 0 | 5.7 | 0 | 7,8 |
| <i>Staphylococcus aureus ATCC 25923</i> | média | 3 | 0 | 0 | 7 | 20 | 3 | 5 | 10 | 2 | 5 | 0 |
| | DP | 4.4 | 0 | 0 | 7.4 | 1.09 | 3.4 | 5.9 | 11.8 | 3 | 9 | 0 |

Legenda:

* OLE30= 30 µL de óleo essencial puro.

* DP= desvio padrão.

Com a realização da metodologia de difusão em discos de papel, pode-se observar que as bactérias mais sensíveis ao óleo essencial do alecrim-do-campo, foram: *Proteus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *E. coli* e *L. monocytogenes*. Já as cepas de *Salmonella Typhimurium* e *S. Panama* e a de *Staphylococcus aureus ATCC 25923* foram resistentes à ação do óleo.

O mesmo resultado pode ser observado com a realização da metodologia de difusão em poços; a média dos halos ficou maior e o desvio padrão (DP) foi menor. Isso provavelmente pelo fato de os antibióticos se difundirem mais rapidamente a partir do poço para o ágar do que por intermédio dos discos de papel para o ágar.

Tabela 2: Teste de difusão em poços com antibióticos e com extrato de óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia*

| MICRO-ORGANISMOS | Halos (mm) | ANTIBIÓTICOS | | | | | OLE 30 µl |
|---|---------------|--------------|----------|-----------|-----------|-----------|--------------|
| | | PEN 10 | RIF 5 | ERI 15 | AMO 10 | CLO 30 | |
| <i>Proteus</i> sp. | média | 5 | 10 | 14 | 10 | 18 | 16 |
| | DP | 3.7 | 0.8 | 8 | 1.3 | 2.2 | 3.4 |
| <i>Staphylococcus</i> sp. | média | 20 | 18 | 22 | 22 | 29 | 17 |
| | DP | 1 | 2 | 2 | 1.8 | 2 | 13 |
| <i>Escherichia coli</i> | média | 9 | 13 | 18 | 19 | 20 | 12 |
| | DP | 0.8 | 2.5 | 1.9 | 1.3 | 2.1 | 2 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | média | 11 | 19 | 10 | 4 | 24 | 13 |
| | DP | 1.3 | 1.1 | 1 | 4.4 | 0.7 | 2.1 |
| <i>Salmonella</i> Typhimurium | média | 13 | 7 | 12 | 8 | 23 | 5 |
| | DP | 2.9 | 6 | 6.6 | 5.2 | 1.9 | 4 |
| <i>Salmonella</i> Panama | média | 6 | 17 | 13 | 4 | 22 | 4 |
| | DP | 4.6 | 3.4 | 2.2 | 5.2 | 2.3 | 4.2 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | média | 11 | 18 | 4 | 12 | 28 | 0 |
| | DP | 1.9 | 2.2 | 4.1 | 3.7 | 2.2 | 0 |

Na metodologia de difusão em poços o Ole30 inibiu *Proteus* sp., *Staphylococcus* sp. e *Listeria monocytogenes*, comparado ao cloranfenicol que apresentou maior média de tamanho de halo de inibição. De forma menos significativa, o óleo essencial de *Baccharis* inibiu *Proteus* sp.

Da mesma forma que nos testes de difusão em disco, as cepas de *Salmonella* apresentaram susceptibilidade baixa ou quase nula ao óleo essencial. Igualmente, *S. aureus* ATCC 25923 mostrou-se resistente ao óleo essencial de *B. dracunculifolia* em ambas as metodologias utilizadas. Entretanto, *Staphylococcus* sp. foi a bactéria que apresentou maior sensibilidade ao óleo em relação aos outros micro-organismos, embora tenha sido sensível ao restante dos demais antibióticos.

3.1 AÇÃO DO NEROLIDOL ISOLADO E EM COMBINAÇÃO A OUTRAS SUBSTÂNCIAS

Para as bactérias Gram negativas, o nerolidol não inibiu *Proteus* sp., *Salmonella* Typhimurium ou *Escherichia coli*. A ausência de atividade inibitória contra essas bactérias Gram negativas pode ser explicada pelo fato de que a membrana externa das bactérias Gram negativas é conhecida por apresentar uma barreira à penetração de determinadas moléculas; o espaço periplasmático contém enzimas, as quais são capazes de quebrar moléculas estranhas introduzidas nesse espaço (DUFFY; POWER, 2001; SARTORI et al., 2003).

No presente estudo, o EDTA na forma isolada, comparado à combinação com o nerolidol, inibiu mais significativamente todas as bactérias. O EDTA aumenta a susceptibilidade das bactérias por desestabilizar a membrana extraíndo os cátions de Ca^{2+} e de Mg^{2+} que estabilizariam o lipopolissacarídeo dessa estrutura (VAARA, 1992). Poderia o nerolidol quando em combinação ao EDTA competir pelos sítios onde a membrana externa dos micro-organismos seria danificada? Se a inibição foi menor na combinação, comparando-se ao EDTA e nerolidol isolados, então é possível sim que haja

competição. A inibição nos testes aqui realizados pode também ter ocorrido em virtude da ação *in vitro* direta, causando desestabilização na membrana de tal forma que inviabilizou a multiplicação do micro-organismo.

Em relação às bactérias Gram positivas aqui analisadas, estas foram inibidas mais significativamente pelo óleo essencial puro (isolado) do que pelo nerolidol puro ou em associação à lisozima. Uma hipótese para explicar esse resultado consiste na existência de sinergismo entre as substâncias presentes no óleo essencial para exercer a atividade antibacteriana. O sinergismo ocorre quando a combinação de dois ou mais compostos é mais eficaz do que cada elemento isolado (VAREL, 2002). O óleo essencial de *B. dracunculifolia* apresenta inúmeras substâncias em sua composição. Essas substâncias podem atuar em sinergismo, causando a inibição do crescimento bacteriano.

O nerolidol testado de forma pura (isolada) inibiu *Staphylococcus* sp. e *Listeria monocytogenes*. Na forma combinada ao EDTA inibiu *Proteus* sp. Em combinação à lisozima, inibiu *S. aureus* ATCC 25923 e *L. monocytogenes* (Gráfico 1).

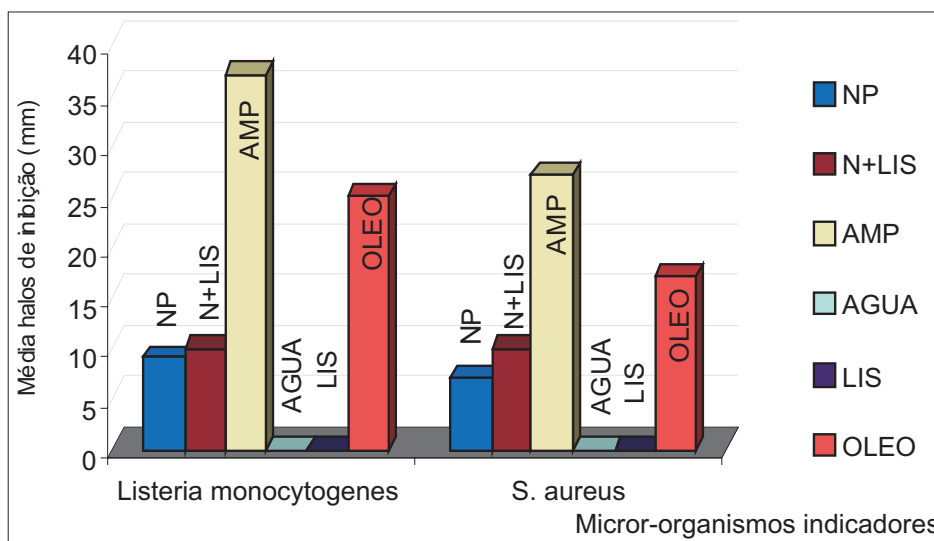


Gráfico 1: Média do tamanho dos halos de inibição no teste de difusão poço para dois micro-organismos: *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Legenda:

NP= nerolidol N+LIS= nerolidol + lisozima; AMP= ampicilina; LIS= lisozima.

De forma já esperada, a lisozima isolada não apresentou efeito inibitório sobre as cepas. Isso porque ela apenas sensibiliza a membrana celular das bactérias. Essa sensibilização deve-se à hidrólise da ligação glicosídica β (1 \rightarrow 4) que une os resíduos de açúcares aminados N-acetilmurâmico e 2-deoxi-N-acetilglicosamina componentes do peptidoglicano da parede celular de bactérias (IBRAHIM; MATSUZAKI; AOKI, 2001). A célula bacteriana fica fragilizada, mas essa condição não a inibe de se multiplicar.

Existem diferenças de inibição entre as duas técnicas utilizadas neste estudo para avaliar a atividade inibitória em ágar, para o mesmo micro-organismo e para as substâncias testadas. Dependendo da bactéria testada pode haver diferença de inibição em razão do ensaio usado, não sendo a diferença necessariamente em virtude da substância, mas da metodologia aplicada. Assim, quanto mais micro-organismos forem testados ante a ação de substâncias com potencial inibitório, com uma ou mais técnicas, mais dados sobre as substâncias testadas podem ser comparados.

4 CONCLUSÃO

O óleo essencial do alecrim-do-campo teve ação inibitória sobre as cepas testadas neste estudo: *Proteus* sp., *Staphylococcus* sp., *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. Já as cepas de *Salmonella* sp. e de *S. aureus* ATCC 25923 não sofreram ação inibitória do óleo.

O nerolidol testado de forma pura inibiu *L. monocytogenes* e *Staphylococcus* sp. Na forma combinada ao EDTA inibiu *Proteus* sp., e em combinação a lisozima inibiu *S. aureus* ATCC 25923 e *L. monocytogenes*.

Os dados obtidos permitem concluir que embora tenha sido possível verificar ação inibitória do nerolidol isolado ou em combinação e do óleo essencial de *B. dracunculifolia* DC. sobre algumas das cepas aqui testadas, há necessidade de um estudo ainda mais abrangente, com outras espécies de micro-organismos Gram positivos e Gram negativos para se estabelecer o potencial antibacteriano de *B. dracunculifolia* DC.

Antibacterial activity of essential oil of Baccharis dracunculifolia DC (Asteraceae) and its active compound nerolidol in combination to EDTA or lysozyme

Abstract

Essential oils of plants are considered sources of biological active substances. The family Asteraceae has been widely studied in relation to its chemical composition and biological activity. In the genus *Baccharis* the flavonoids and terpenoids are the most commonly studied compounds. *B. dracunculifolia* DC, is native to the Brazilian cerrado and considered the main botanical source of green propolis. The aims of this study were to evaluate the antibacterial activity of the essential oil from leaves and flowers of *B. dracunculifolia* and its active compound, the nerolidol. This compound was utilized pure or in combined form with EDTA or with lysozyme against Gram positive and negative pathogenic bacteria strains. The techniques of well diffusion agar and disc diffusion filter paper were utilized to test antibacterial activity of the following substances: essential oil of *B. dracunculifolia* (Ole30), pure nerolidol or combined with EDTA or lysozyme, and different antibiotics used as control: gentamicin, tetracycline, streptomycin, oxacillin, chloramphenicol, vancomycin, penicillin, amoxicillin, rifampin and erythromycin. The most inhibited bacteria by the Ole30 were: *Proteus* sp., *Staphylococcus* sp., *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. In well diffusion assay, both Ole30 and chloramphenicol inhibited *Proteus* sp., *Staphylococcus* sp. and *L. monocytogenes* but *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium and *S. Panama* were resistant to the Ole30. In both techniques *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was resistant to the Ole30. The nerolidol inhibited *Staphylococcus* sp. and *L. monocytogenes*, and combined with EDTA inhibited *Proteus* sp. and combined with lysozyme inhibited *S. aureus* ATCC 25923 and *L. monocytogenes*.
Keywords: Antibacterial. Essential oil. Diffusion in Agar. Nerolidol.

REFERÊNCIAS

ARRUDA, D. C.; D'ALEXANDRI, A. M. K.; ULIANA, S. R. B. Antileishmanial Activity of the Terpene Nerolidol. **Antimicrob Agents and Chemother**, v. 49, n. 5, p. 1.679-1.687, 2005.

BRASIL. Ministério da Agropecuária e Abastecimento. **EMBRAPA**, Meio Ambiente, v. 4, n. 14, 1996.

_____. **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão; Norma Aprovada**. 8. ed. Tradução Silvia Figueiredo Costa (Coord.). São Paulo: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003. 55 p. Tradução de: NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard.

CARRERA, R. C. **Baccharis trimera (Less.) DC. (Asteraceae)**: estudo comparativo dos óleos voláteis, atividade biológica e crescimento de estacas de populações ocorrentes em áreas de Cerrado e Mata Atlântica. 2007. 191 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente)–Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2007. Disponível em: <http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/teses_dissert/RosanaDr2007.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2009.

DUFFY, C. F.; POWER, R. F. Antioxidant and antimicrobial properties of some chinese plant extracts. **Int. J. Antimicrobial Agents**, v. 17, p. 527-529, 2001.

FAINI, F. A.; CASTILLO, M. Y.; TORRES, M. R. Flavonoids of *Baccharis incarum*. **J. Nat. Prod.**, v. 45, n. 4, p. 501-502, 1982.

FIGUEIREDO, A. S. G. et al. Estudo do efeito do *Baccharis dracunculifolia* sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos e influência de fatores sazonais sobre esta atividade. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 14., 2006. São Paulo. **Anais eletrônicos...** São Paulo: Ed. USP, 2006. Disponível em: <<http://www.usp.br/siicusp/Resumos/14Siicusp/462.pdf>>. Acesso em: 15 maio 2009.

FRIZZO, C. D. et al. Extração supercrítica do óleo essencial de planta nativa do gênero *Baccharis*. In: INTERAMERICAN CONGRESS OF CHEMICAL ENGINEERING, 19., 2000, Águas de São Pedro; CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 12., 2000, Águas de São Pedro; BRAZILIAN CONGRESS OF PHASE EQUILIBRIUM AND FLUID PROPERTIES FOR CHEMICAL PROCESS DESIGN, 1., 2000, Águas de São Pedro. **Anais eletrônicos...** Águas de São Pedro, 2000. Disponível em: <dpi.eq.ufrj.br/Anais_A/COBEQ_2000/pdf/243.pdf>. Acesso em: 14 maio 2008.

HARRIS, L. J.; DAESCHEL, M. A.; KLAENHAMMER, T. R. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.**, v. 52, n. 6, p. 384-387, 1989.

HUFF, G. F. **Farmacognosia**: Da Planta ao Medicamento. 1. ed. Rio Grande do Sul: Ed. UFRGS, 1999.

IBRAHIM, H. R.; MATSUZAKI, T.; AOKI, T. Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic fusion. **FEBS Letters**, v. 506, p. 27-32, 2001.

JARVIS, B. B. et al. Trichothecene micotoxins from *Baccharis* species. **Phytochemistry**, Oxford, v. 30, n. 3, p. 789-797, 1991.

KELSEY, R. G. et al. (Org.). **Biology and Chemistry of plant trichomes**. New York: Plenum Press, 1984.

LEITÃO, D. P. S. **Estudo comparativo do efeito in vitro de extrato de própolis verde e extratos de *Baccharis dracunculifolia* sobre fatores de virulência de *Streptococcus mutans*, relacionados à cárie dental**. 2005. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)–Universidade São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

MACEDO, C. S. et al. Characterization of the isoprenoid chain of coenzyme Q in *Plasmodium falciparum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 207, n. 1, p. 13-20, 2002.

PAULINELLI, T. et al. Análise do óleo essencial de dois espécimes de *Baccharis cf dracunculifolia*. In: REUNIÃO ANUAL SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 27., 2004, São Paulo; CONGRESSO LATINOAMERICANO DE QUÍMICA, 26., 2004, São Paulo. **Anais eletrônicos...** Disponível em: <<http://74.125.93.132/search?q=cache%3AQaKHr5wS26sJ%3A143.107.52.76%2Fresumos%2F27RA%2FT00839E1.pdf+paulinelli+oleos+volateis&hl=pt-BR&gl=br>>. Acesso em: 13 maio 2008.

QUEIROGA, C. L. **Estudo fitoquímico do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia***. 1989. 193 f. Dissertação (Mestrado em Química)–Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1989.

SARTORI, M. R. K. et al. Antifungal activity of fractions and two pure compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (*Acmetia brasiliensis*) (Asteraceae). **Pharmazie**, v. 58, n. 8, p. 567-569, 2003.

SOUZA, C. A. S. et al. Atividade antimicrobiana de *Tagetes Minuta* L. Compositae (Chinchilho) Frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 37, n. 6, 2000.

VAARA, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. **Microbiol. Rev.**, v. 56, n. 3, p. 395-411, 1992.

VAREL, V. H. Carvacrol and thymol reduce swine waste odor and pathogens: stability of oils. **Curr. Microbiol.**, n. 44, p. 38-43, 2002.

VERDI, L. G.; BRIGHENTI, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

ZOMLEFER, W. B. **Guide to flowering plant families**. Chapel Hill & London; Carolina, USA, 1994.

Agradecimentos

Ao apoio técnico laboratorial de Isabel Olivo Munaro, Laboratório de Microbiologia, Núcleo Biotecnológico, Unoesc *Campus* de Videira, SC; ao Fundo de Apoio à Pesquisa; à Unoesc e à bolsa de pesquisa recebida por intermédio do Artigo 170, Governo do estado de Santa Catarina.

Recebido em 20 de outubro de 2009

Aceito em 26 de novembro de 2009