



**UnB**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CEILÂNDIA  
CURSO DE FARMÁCIA**

GABRIELA MARQUES BATISTA ARCANJO COSTA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO DE EXTRATOS E  
DE ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM DO CAMPO (*Baccharis  
dracunculifolia*)**

BRASÍLIA, DF

2016

GABRIELA MARQUES BATISTA ARCANJO COSTA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO DE EXTRATOS E DE  
ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM DO CAMPO (*Baccharis dracunculifolia*)**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada  
como requisito parcial para obtenção do grau de  
Farmacêutico, na Universidade de Brasília,  
Faculdade de Ceilândia.

**Orientador: Prof. Dr. Elton Clementino da Silva**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi**

BRASÍLIA, DF

2016

GABRIELA MARQUES BATISTA ARCANJO COSTA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO DE EXTRATOS E DE  
ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM DO CAMPO (*Baccharis dracunculifolia*)**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Elton Clementino da Silva  
(FCE/ Universidade de Brasília)

---

Profa. Dra. Izabel Cristina da Silva  
(FCE/ Universidade de Brasília)

---

Prof. Dr. Daniel Oliveira Freire  
(Faculdade LS)

BRASÍLIA, DF

2016

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar e como agradecimento mais importante, agradeço a Deus por cada dia da minha vida e por me sustentar em seus braços sempre que meus pés não podiam mais.

Agradeço aos meus pais Claudionor e Francisca por darem suas vidas pela minha, por trabalharem incansavelmente para prover todo o necessário e muito mais. Obrigada por cada noite não dormida, por cada lágrima e cada conquista que realizaram pensando em mim. Amo vocês de uma forma impossível de explicar.

Agradeço a meu esposo Allan pelo companheirismo desde o primeiro dia de namoro até hoje. Por entender minhas ausências e me fornecer um ombro amigo e um colo acolhedor sempre que procurei. Um amor nascido no coração de Deus para a vida toda.

Agradeço aos meus familiares, especialmente meu irmão Bruno por dividir comigo uma vida de alegrias e tristezas e estar ali constantemente me amando. Minha avó Efigênia por sua preocupação com meu bem-estar e amor. Por minha tia Titchá, pela maior torcida que tenho em tudo na vida.

Agradeço aos amigos que estiveram comigo em toda a graduação, em especial ao grupo Éramos 5, Samia Vieira, Rachel Bedatt e Amanda Almeida.

Agradeço infinitamente à brilhante Professora Daniela Castilho pela imensa ajuda para esse trabalho ser realizado, sem a qual não teria sido possível, por fazer muito mais do que seu dever como docente, mas se preocupar como nenhum outro. Agradeço ao Professor Elton Clementino pela orientação. Ao colega Igor Souza pelos inúmeros socorros de última hora e sua disponibilidade sem pedir nada em troca.

Sou grata a todos os mestres da graduação que contribuíram para minha formação como profissional. Agradeço ao Professor Christopher William, à Professora Izabel Cristina, ao Professor Daniel Oliveira e ao Professor Juliano Chaker por cada contribuição ao trabalho.

A todos os funcionários da Faculdade de Ceilândia pela convivência e colaboração

## SUMÁRIO

1. Introdução	11
1.1. <i>Baccharis dracunculifolia</i>	11
1.2. Composição química dos extratos e do óleo da <i>B. dracunculifolia</i>	12
1.3. Propriedades medicinais da <i>Baccharis dracunculifolia</i>	16
1.4. A busca por novos compostos antimicrobianos	18
1.5. <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i>	19
2. Justificativa	21
3. Objetivo geral	22
3.1. Objetivos específicos	22
4. Metodologia	23
4.1. Coleta das amostras	23
4.2. Obtenção dos extratos	23
4.3. Obtenção do óleo essencial	24
4.4. Microrganismos avaliados	25
4.5. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos pelo Método de Difusão em Disco	25
4.6. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos pelo Método de Perfuração em Ágar	26
4.7. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos pelo Método pelo método de microdiluição em caldo	27
5. Resultados e Discussão	28
5.1. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de <i>Baccharis dracunculifolia</i> pelo Método de Difusão em Disco	28
5.2. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de <i>Baccharis dracunculifolia</i> pela técnica de perfuração em ágar	29
5.3. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>Baccharis dracunculifolia</i> pelos Métodos de difusão em disco e de perfuração em ágar	30
5.4. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de <i>Baccharis dracunculifolia</i> pelo método de microdiluição em caldo	34
6. Conclusão	38
7. Referências Bibliográficas	39

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Halos médios de inibição (em mm) para o óleo essencial de *B. dracunculifolia* pelo método de Difusão em Disco\_\_\_\_\_ 30
- Tabela 2.** Halos médios de inibição (em mm) o óleo essencial de *B. dracunculifolia* pelo método de perfuração em ágar\_\_\_\_\_ 30
- Tabela 3.** Halos médios de inibição (em mm) para os antibióticos gentamicina, norfloxacin e tetraciclina\_\_\_\_\_ 33

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Arbusto de <i>Baccharis dracunculifolia</i> na Fazenda Água Limpa, UNB_____	11
<b>Figura 2.</b> Estruturas químicas dos monoterpenos e sesquiterpenos presentes na <i>B. dracunculifolia</i> _____	13
<b>Figura 3.</b> Estruturas químicas de ácidos fenólicos presentes na <i>B. dracunculifolia</i> _____	14
<b>Figura 4.</b> Folhas secas e trituradas de <i>B. dracunculifolia</i> _____	23
<b>Figura 5.</b> Rotaevaporação dos solventes dos extratos de <i>B. dracunculifolia</i> _____	24
<b>Figura 6.</b> Extração de óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i> _____	25
<b>Figura 7.</b> Teste de difusão de disco para os extratos hexânico e etanólico de <i>Baccharis dracunculifolia</i> _____	28
<b>Figura 8.</b> Técnica de perfuração em ágar para os extratos hexânico e etanólico de <i>Baccharis dracunculifolia</i> _____	29
<b>Figura 9.</b> Teste de difusão em disco para o óleo essencial de <i>Baccharis dracunculifolia</i> _____	31
<b>Figura 10.</b> Teste de perfuração em ágar para o óleo essencial de <i>Baccharis dracunculifolia</i> _____	31
<b>Figura 11.</b> Teste de difusão em disco com antibióticos de referência_____	34
<b>Figura 12.</b> Método de microdiluição em caldo utilizando o extrato etanólico de <i>Baccharis dracunculifolia</i> _____	35
<b>Figura 13.</b> Método de microdiluição em caldo utilizando o extrato hexânico de <i>Baccharis dracunculifolia</i> _____	35

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Inibição de crescimento bacteriano em relação ao controle negativo obtido pelo método de microdiluição em caldo utilizando o extrato hexânico de *Baccharis dracunculifolia*\_\_\_\_\_ 36
- Gráfico 2.** Inibição de crescimento bacteriano em relação ao controle negativo obtido pelo método de microdiluição em caldo utilizando o extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia*\_\_\_\_\_ 37

## RESUMO

A questão da resistência bacteriana aos antimicrobianos convencionais torna urgente a busca por novos fármacos antimicrobianos. As espécies vegetais do bioma Cerrado, por apresentarem em sua composição variados constituintes metabólitos secundários, são apontadas como excelentes alvos de busca por sua potencial atividade biológica e de inibição microbiana. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de extratos hexânico e etanólico e de óleo essencial de alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*) coletado na região do DF frente às bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705. No método de microdiluição em caldo, os extratos hexânico e etanólico de *Baccharis dracunculifolia* apresentaram atividade antimicrobiana para as cepas de *S. aureus* e de *K. pneumoniae*. Para a avaliação de potencial de atividade antimicrobiana dos extratos de alecrim do campo, o método de microdiluição em caldo mostrou-se mais adequado que o método de difusão em disco. O óleo essencial de alecrim do campo apresentou inibição sobre as cepas de *S. aureus* e de *K. pneumoniae*. Os discos contendo 20 µL de óleo essencial apresentaram valores médios de halos de inibição 20,6 a 22,6 mm para *S. aureus* e valores médios de halos de inibição de 24 a 25 mm para *K. pneumoniae* pelo método de difusão em disco. Esses valores ficaram maiores que os halos de interpretação de antibiograma usando gentamicina, norfloxacina e tetraciclina, indicando sensibilidade dessas bactérias ao óleo essencial de alecrim do campo.

**Palavras chave:** *Baccharis dracunculifolia*, extrato, óleo essencial, atividade antimicrobiana.

## ABSTRACT

The matter of bacterial resistance to conventional antibiotics makes urgent the search for new antimicrobial drugs. Plant species of the Cerrado biome, due to their secondary metabolites composition, are seen as prime targets in the search for its potential biological activity and microbial inhibition. This study aimed to evaluate the in vitro antibacterial activity of hexane and ethanol extracts and essential oil of “alecrim do campo” (*Baccharis dracunculifolia*) collected in the DF region against bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Klebsiella pneumoniae* BAA in 1705. In the method of microdilution broth, the hexane and ethanol extracts of *Baccharis dracunculifolia* presented antimicrobial activity against the strains of *S. aureus* and *K. pneumoniae*. For the evaluation of potential antimicrobial activity of “alecrim do campo” extracts, the microdilution broth method was more appropriate when compared to disk diffusion method. The essential oil of “alecrim do campo” showed inhibition of strains of *S. aureus* and *K. pneumoniae*. The discs containing 20 µL of essential oil showed mean values of inhibition halos of 20.6 to 22.6 mm for *S. aureus* and mean values of inhibition halos of 24 to 25 mm for *K. pneumoniae* by disk diffusion method. These values were higher than the antibiogram interpretation of halos using gentamicin, norfloxacin and tetracycline, indicating sensitivity of these bacteria to “alecrim do campo” essential oil.

**Key words:** *Baccharis dracunculifolia*, extract, essential oil, antimicrobial activity.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Baccharis dracunculifolia*

O gênero *Baccharis* pertence à família Asteraceae que é o grupo sistemático mais numeroso das angiospermas, compreendendo cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies. Esse gênero possui aproximadamente 500 espécies distribuídas no continente americano, das quais 120 espécies ocorrem no Brasil, sendo o Cerrado brasileiro uma das áreas mais ricas em espécies do gênero *Baccharis* (BUDEL et al., 2005; VERDI, et al., 2005). De acordo com SILVA (2013) são encontradas mais de 55.000 espécies de *Baccharis* em um patrimônio estimado entre 350.000 a 550.000 espécies no bioma Cerrado.

*Baccharis dracunculifolia* DC. é popularmente conhecida como alecrim do campo, vassourinha do campo, alecrim de vassoura ou vassourinha e ocorre naturalmente no Brasil, Paraguai, Argentina, Uruguai e nos altos vales da Bolívia (CASSEL et al., 2000). *B. dracunculifolia* ocorre principalmente nas Regiões Sudeste, Centro-Oeste e Sul do Brasil, nas áreas de cerrado (BASTOS, 2001). Trata-se de um arbusto lenhoso de crescimento rápido podendo medir até 4,0 m de altura (Figura 1) (NAKAJIMA et al., 2015).



Figura 1. Arbusto de *Baccharis dracunculifolia* na Fazenda Água Limpa, UNB.

A epiderme foliar de *B. dracunculifolia* possui tricomas agrupados e distribuídos regularmente pelo limbo, sendo que seus ápices foliares apresentam grande número de tricomas glandulares que proporcionam elevada secreção de material resinoso de composição variada. Materiais resinosos secretados pelas plantas consistem de uma variedade de compostos, incluindo: flavonoides, agliconas, ceras, gorduras, terpenos e óleos essenciais. Os terpenoides e muitos compostos aromáticos, como flavonoides e derivados do ácido cumárico, estão frequentemente presentes nos tricomas glandulares de várias espécies vegetais da família Asteraceae (SANTOS 2011).

A alta produção de metabólitos secundários nesse material resinoso pode ter contribuído para o sucesso evolutivo da *B. dracunculifolia* na defesa contra insetos e microrganismos (SANTOS 2011). As resinas compostas de terpenos ocorrem nas superfícies de folhas e caules e o alecrim do campo é a principal fonte botânica da resina e dos constituintes químicos da própolis brasileira (própolis verde) produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera* (ALENCAR et al., 2005, PARK et al., 2004).

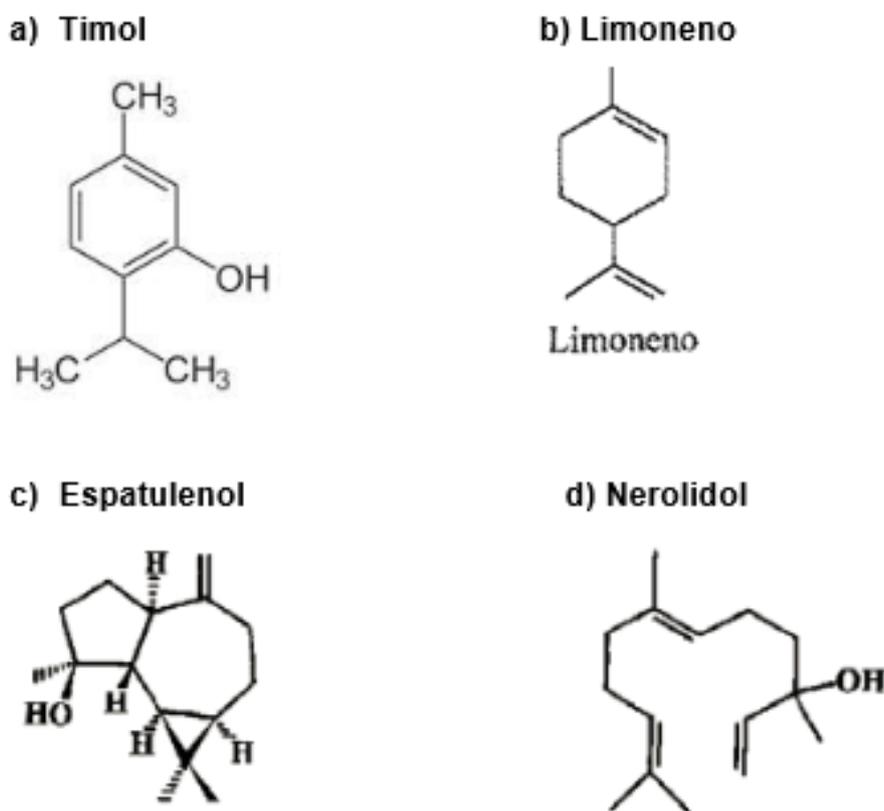
*B. dracunculifolia* destaca-se por se associar a um grande número de insetos herbívoros. Em geral, os compostos secundários das plantas são tóxicos e inibem o ataque de insetos. Entretanto, alguns herbívoros coletam esses compostos para sua própria defesa, como as abelhas de espécie *Apis mellifera*, que coletam e transportam os ápices caulinares de *B. dracunculifolia* para o interior da colmeia, para a produção da própolis verde que auxilia na defesa da colmeia contra seus próprios predadores (BASTOS, 2001).

## **1.2. Composição química dos extratos e do óleo da *B. dracunculifolia***

*B. dracunculifolia* tem sido estudada do ponto de vista fitoquímico revelando uma grande variedade de constituintes químicos com atividade biológica e destacam-se os efeitos antimicrobianos e anti-inflamatórios. Estudos mostram que as inúmeras atividades biológicas da própolis verde decorrem exclusivamente dos constituintes presentes na *B. dracunculifolia* (LEMOS et al., 2007; PAULINO et al., 2008; NAKANISHI et al., 2003).

Em relação ao perfil fitoquímico dos extratos e do óleo da *B. dracunculifolia*, pode-se observar que é caracterizado pelo acúmulo de sesquiterpenos, monoterpenos, diterpenos, triterpenos e flavonoides (AGOSTINI et al., 2005).

Fukuda et al. (2006) isolaram das folhas do alecrim do campo compostos como os monoterpenos fenólicos: timol e limoneno e os sesquiterpênicos: espatulenol e nerolidol (Figura 2).

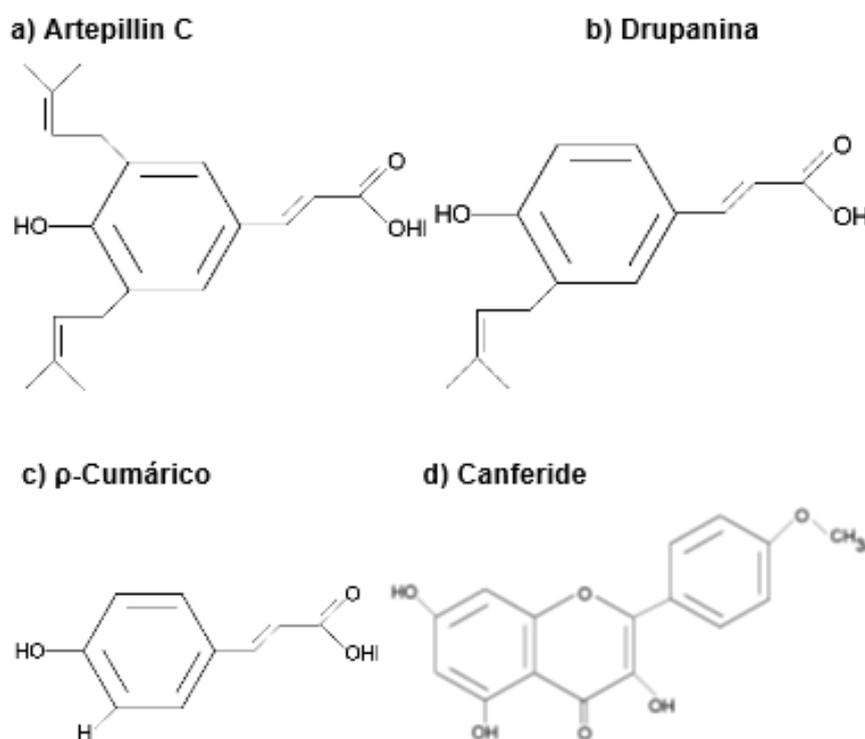


**Figura 2. Estruturas químicas dos monoterpenos e sesquiterpenos presentes na *B. dracunculifolia*. Fontes: FABIANE et al. (2008), MEDEIROS (2014), NUNES et al. (2000).**

Os terpenoides (terpenos e seus análogos oxigenados) representam uma classe bastante variada e extensa de compostos. Eles são formados por várias unidades de isoprenos ( $C_5H_8$ ) unidas e esses compostos são subdivididos em classes de acordo com o número de unidades de isopreno existentes. Os monoterpenos são isômeros compostos por duas unidades de isoprenos, isto é, possuem 10 átomos de carbono. Os sesquiterpenos são formados por três unidades de isoprenos, ou seja, 15 carbonos, enquanto, os diterpenos, os triterpenos e os tetraterpenos (carotenoides) são formados, respectivamente, por quatro, seis e oito unidades de isoprenos. Tanto os triterpenos como os tetraterpenos são compostos muito pesados (apresentam elevado peso molecular) e, por essa razão, não são

encontrados em óleos essenciais (que contém somente substâncias voláteis), mas estão presentes nos extratos dos vegetais (MEDEIROS, 2014).

A espécie *Baccharis dracunculifolia* também demonstra a presença de vários ácidos fenólicos, como cafeico, *p*-cumárico (ácido 4-hidroxicinâmico), 3-prenil-*p*-cumárico (drupanina), 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C) e 4'-metoxi-3,5,7-triidroxiflavona (canferide) (Figura 2) (ALENCAR et al., 2005, PARK et al., 2004).



**Figura 3. Estruturas químicas de ácidos fenólicos presentes na *B. dracunculifolia*. Fonte: PIANTINO (2008).**

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, nas formas simples ou de polímeros. A presença desses compostos em plantas tem sido muito estudada por apresentarem atividades farmacológicas e também por inibirem a oxidação lipídica e a proliferação de fungos. Os compostos fenólicos estão presentes em vegetais na forma livre ou complexada a açúcares e proteínas. A diversidade estrutural desses compostos deve-se à grande variedade de combinações que acontece na natureza e os compostos resultantes são chamados de polifenóis. Estas combinações fenólicas podem ser divididas em três grupos: ácidos fenólicos (ácidos benzóicos, cinâmico e seus

derivados), flavonoides (antocianinas, flavonóis e seus derivados) e taninos (PIANTINO, 2008).

A composição dos extratos e do óleo da *B. dracunculifolia* depende da região geográfica e do processo de extração utilizado (FERRONATTO et al., 2007). Parreira et al. (2010) relataram que o óleo essencial de alecrim do campo coletado do município de Franca, SP, foi composto principalmente por sesquiterpenos e monoterpenos, com a presença de nerolidol (33,51%), espatulenol (16,24%),  $\alpha$ -murolool (4,66%), d-cadineno (3,66%), biciclogermacreno (3,42%),  $\beta$ -cariofileno (2,28%) e germacreno D (2,18%), perfazendo 66% da composição do óleo essencial.

No trabalho de SANTOS (2011) a análise cromatográfica dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* (coletado do município de Botucatu, SP), detectou a presença majoritária de nerolidol (33,81%), espatulenol (18,96%), óxido de cariofileno (5,63%),  $\gamma$ -muuroleno (5,25%) e valenceno (5,15%), perfazendo 69% da composição do óleo essencial.

Já no estudo de PIANTINO (2008), as análises dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* (coletado do município de Campinas, SP), indicaram que o teor de monoterpenos variou de 16,5 a 26,5%, o teor de hidrocarbonetos sesquiterpênicos variou de 60,8 a 74,3% e o teor de álcoois sesquiterpênicos variou de 5,1 a 10,7%. Os compostos majoritários foram os hidrocarbonetos sesquiterpênicos: germacreno D (21,4 a 26,1%), biciclogermacreno (18,3 a 20,9%), *trans*-cariofileno (14,3 a 16,4%) e os monoterpenos limoneno (7,6 a 14,3%) e b-pineno (6,5 a 9,4%).

Segundo ALMEIDA et al. (2005), os compostos voláteis sesquiterpênicos possuem atividades antibacterianas, fungicidas e inseticidas. O espatulenol é um sesquiterpeno que apresenta atividade biológica com propriedades antibacterianas e moderada atividade citotóxica (LIMBERGER et al., 2004). O nerolidol também é um sesquiterpeno e apresenta efeito inibidor do crescimento do *Plasmodium falciparum*, o agente causador da malária (MACEDO et al., 2002). No trabalho de ARRUDA et al. (2005), o nerolidol inibiu o crescimento de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi* e formas amastigotas de *Leishmania amazonenses*. O tratamento de macrófagos infectados com *L. amazonenses* (causador da leishmaniose tegumentar americana), com nerolidol resultou em redução de 95% de infecção nos ratos.

Analisando a composição química da própolis e da *B. dracunculifolia*, ALENCAR et al. (2005) e PARK et al. (2004) identificaram químicas flavonoides e ácidos fenólicos idênticos. Portanto, comprovaram que esta espécie vegetal é a principal fonte utilizada pelas abelhas *Apis mellifera* para a elaboração da própolis produzida nos estados de São Paulo e Minas Gerais. Dentre os compostos majoritários encontrados no extrato metanólico da folha da *B. dracunculifolia* e no extrato etanólico da própolis, o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C) teve a maior concentração.

Segundo UTO et al. (2002), o Artepillin C apresenta atividade antimicrobiana e antioxidante. Antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais e como quelantes de metais. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias (PIANTINO, 2008).

No estudo de KIMOTO et al. (2001), o Artepillin C inibiu a peroxidação lipídica e o desenvolvimento de câncer pulmonar em ratos e no estudo de SHIMIZU et al. (2005), o Artepillin C foi um importante quimiopreventivo na carcinogênese do cólon, por meio da indução da interrupção do ciclo celular.

### **1.3. Propriedades medicinais da *Baccharis dracunculifolia***

A *B. dracunculifolia* há bastante tempo é utilizada na medicina caseira por populações locais. Em geral o alecrim do campo é consumido na forma de chás com indicações para distúrbios gástricos, cansaço físico, inapetência, afecções febris, inflamações e diabetes (MELO et al., 2001; MENEZES, 2005).

Tanto a própolis verde quanto os derivados vegetais (extratos e óleo essencial) do alecrim do campo são reconhecidos medicinalmente por suas várias atividades biológicas, especialmente agindo como antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiprotozoária, anti-inflamatória, antioxidante, imunomoduladora e analgésica (LEMOS et al., 2007; MISSIMA et al., 2007; PAULINO et al., 2008; NAKANISHI et al., 2003).

O óleo essencial das folhas de *B. dracunculifolia* tem sido avaliado em diversos estudos em aplicações farmacológicas. No estudo de PARREIRA et al. (2010) o óleo essencial das folhas de *B. dracunculifolia* foi ativo contra formas promastigotas de *Leishmania donovani* e apresentou alta atividade esquistomicida,

sendo que as formas adultas de *Schistosoma mansoni* foram mortas após incubação com o óleo essencial nas concentrações de 10, 50 e 100 mg/mL.

No estudo de FERRONATO et al. (2007), a capacidade antibacteriana do óleo essencial de *B. dracunculifolia* foi avaliado pelo método de difusão em disco de papel, em placas de Petri contendo meio de Müller-Hinton, semeadas com suspensões bacterianas de 3 cepas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Os resultados revelaram que o óleo essencial de *B. dracunculifolia* apresentou atividade antimicrobiana sobre *S. aureus*, *E. coli* e baixa atividade inibitória sobre *P. aeruginosa*.

No estudo de GALVÃO et al. (2012) constatou-se a eficácia desse óleo sobre cepas de *Streptococcus mutans*. Os resultados indicaram que o óleo essencial de alecrim do campo apresentou atividade bactericida em concentrações baixas, sendo considerado um possível agente a ser incorporado em formulações destinadas a redução de biofilme dental. FONSECA et al. (2012) avaliaram a atividade antifúngica do extrato e do óleo essencial de *B. dracunculifolia* e verificaram que o crescimento de *Fusarium oxysporum* foi reduzido significativamente a partir de 500 µL/L de extrato aquoso e a partir de 250 µL/L de óleo de alecrim-do-campo.

MASSIGNANI et al. (2009) avaliaram o efeito do óleo essencial de *B. dracunculifolia* no tratamento de úlcera gástrica em ratos. O tratamento com doses de 50, 250 e 500 mg/kg de óleo essencial diminuiu significativamente as lesões. Considerando os resultados obtidos, os autores concluíram que o óleo essencial de *B. dracunculifolia* poderia ser usado como um novo agente terapêutico no tratamento da úlcera gástrica. FLORÃO et al. (2012) reportaram atividade anti-inflamatória do óleo essencial de *B. dracunculifolia* testado em células humanas responsáveis por mecanismos de defesa do hospedeiro, sugerindo que seu uso pode ser benéfico na intervenção de desordens imunológicas associadas ou não com condições inflamatórias.

#### **1.4. A busca por novos compostos antimicrobianos**

O problema da resistência a antimicrobianos em populações bacterianas tem se agravado muito nos últimos anos, especialmente nas infecções de origem hospitalar e drogas que antes se mostravam eficazes na rotina clínica tem perdido sua eficácia contra a maioria das cepas isoladas (FERRONATO et al., 2007). A questão da resistência bacteriana aos antibióticos torna urgente a busca por novos compostos bioativos que representem novas possibilidades de aplicação antimicrobiana (AGUIAR et al., 2012; FRIEDMAN, 2007).

A resistência antimicrobiana e a sua disseminação entre bactérias são geralmente consequência da pressão seletiva dos antibióticos. As bactérias resistentes são transmitidas entre doentes e os fatores de resistência são transferidos entre bactérias sendo, em ambas as situações, mais frequentes em instituições de saúde. O uso contínuo de antimicrobianos aumenta a pressão seletiva, favorecendo a emergência, multiplicação e disseminação de bactérias resistentes. O uso inapropriado e não controlado de agentes antimicrobianos, incluindo a prescrição excessiva, administração de doses sub-terapêuticas, duração insuficiente de tratamento e erros de diagnóstico levando à escolha incorreta de fármacos, contribuem para esta situação (JACOBY et al, 2010; MAULDIN et al., 2010).

Apesar dos antibacterianos derivados de plantas serem menos potentes, os vegetais combatem infecções com sucesso. Para isso adotam a estratégia do sinergismo, um mecanismo onde dois diferentes compostos são combinados para aumentar suas atividades individuais. Essa estratégia tem servido de inspiração para as pesquisas voltadas a descoberta de compostos que tem como finalidade atuar nos mecanismos de resistência bacteriana, minimizando-os (HEMAISWARYA et al., 2008).

No início de 2000, programas de descoberta de antibióticos a partir de fontes naturais foram retomados em algumas indústrias farmacêuticas (GUIMARÃES et al. 2010). Por este motivo, atualmente várias pesquisas atuam nas áreas de produtos naturais, explorando possíveis alternativas no tratamento de infecções causadas por micro-organismos resistentes aos antibióticos disponíveis. As espécies vegetais do bioma Cerrado, por apresentarem em sua composição variados constituintes

metabólitos secundários, são apontadas como excelentes alvos de escolha por sua potencial atividade biológica e de inibição microbiana (SILVA, 2013).

### 1.5. *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococcaceae, são bactérias Gram positivas, imóveis, agrupadas em massas irregulares ou cachos de uva, anaeróbias facultativas e catalase positivas. Os *Staphylococcus aureus* são coagulase positivos, beta-hemolíticos e fermentadores de manitol. Apesar de serem classificados como microrganismos mesófilos, demonstram crescimento em temperaturas entre 7,0 e 47,8°C (TORTORA et al., 2005).

*Staphylococcus aureus* é um importante agente etiológico de diversas infecções. Cerca de 30-40% da população humana porta *S. aureus* na orofaringe e na pele, este patógeno pode produzir infecções oportunistas em pacientes sob situações de risco, como no caso de internações hospitalares, procedimentos invasivos e imunossupressão. Nestes casos, esta bactéria pode causar diferentes processos infecciosos, desde uma infecção cutânea até uma infecção sistêmica grave (TORTORA et al., 2005).

A partir da década de 70, o *S. aureus* passou a ser um patógeno emergente nas infecções hospitalares, pois as cepas isoladas apresentavam resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (TOHIDPOUR et al., 2010). As cepas com este perfil de resistência foram denominadas de MRSA (*Methicillin Resistance Staphylococcus aureus*). Houve rápida disseminação das cepas MRSA nos ambientes hospitalares e estas se apresentaram sensível apenas aos glicopeptídeos vancomicina e teicoplanina, que são nefrotóxicos (ZUO et al., 2008). Nos últimos 10 anos, as cepas de MRSA, que eram restritas ao ambiente hospitalar, passaram a ser isoladas em pacientes com infecção de pele na comunidade, sem relato de internação nos últimos meses. Esta nova cepa foi denominada de CA-MRSA (*Community-associated MRSA*) (BENOIT et al., 2008).

Os glicopeptídeos tem sido o pilar para o tratamento de infecções por MRSA desde sua introdução no mercado em 1958, ainda assim houve o isolamento de enterococos resistentes (VRE, *vancomycin-resistant Enterococci*) e de estafilococos coagulase-negativos com susceptibilidade diminuída no final da década de 1980. Quase uma década depois em 1997, no Japão, foi reportada a primeira cepa com

concentração inibitória mínima para vancomicina de 8 µg/ml e o primeiro isolamento com uma CIM >32 µg/ml foi registrado nos Estados Unidos em meados de 2002. Existe a preocupação de que tal cepas sejam resistentes a todos os outros antimicrobianos disponíveis (panresistentes), porém em revisão RODRIGUEZ (2005) concluíram que a situação não é tão crítica já que as cepas encontradas podem ser tratadas com antibióticos de amplo uso clínico como trimetoprima-sulfametoxazol, ou recém aprovados como linezolida. É de suma importância implementar estratégias rigorosas de monitorização para detectar e tratar rapidamente novas cepas isoladas, aplicar medidas adequadas de barreiras para evitar a disseminação e insistir no Uso Racional dos antimicrobianos (RODRIGUEZ, 2005).

A bactéria *Klebsiella pneumoniae* é um bacilo Gram-negativo amplamente distribuído na natureza e no trato gastrointestinal. Trata-se de uma bactéria oportunista, podendo causar pneumonias primárias em indivíduos debilitados, como alcoolistas, diabéticos e associadas a outras doenças pulmonares (BEN-DAVID et al., 2011). Estas cepas podem causar também infecções extrapulmonares, como sepse, meningites e infecções do trato urinário (YIGIT et al., 2012). Durante as últimas décadas, observou-se um aumento na propagação de perfis de resistência ESBL (*Extended-Spectrum β-Lactamase*) em *K. pneumoniae*. Então, para o controle das infecções passou-se a fazer uso, em larga escala, de antimicrobianos da classe dos carbapenêmicos, tais como imipenem e meropenem. A partir de 2001, surgiram as cepas CRKP (*Carbapenem-resistant K. pneumoniae*) ou KPC. Hoje as cepas KPC são encontradas com frequência em unidades hospitalares em todo o mundo.

Esses fatos intensificam a ineficiência ascendente dos agentes antimicrobianos fornecidos no mercado atual e reforçam a necessidade da disponibilização de novos agentes terapêuticos antimicrobianos.

## 2. Justificativa

A questão da resistência bacteriana aos antimicrobianos convencionais torna urgente a busca por novos fármacos antimicrobianos. As espécies vegetais do bioma Cerrado, por apresentarem em sua composição variados constituintes metabólitos secundários, são apontadas como excelentes alvos de busca por sua potencial atividade biológica e de inibição microbiana. Assim, esse trabalho visa avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de extratos hexânico e etanólico e de óleo essencial de alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*) coletado na região do DF.

### 3. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de extratos hexânico e etanólico e de óleo essencial de alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*) coletado na região do DF frente às bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705.

#### 3.1. Objetivos específicos

- Produzir os extratos hexânico e etanólico de *Baccharis dracunculifolia*
- Produzir o óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia*
- Testar capacidade antimicrobiana dos extratos e do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* pelo método de difusão em disco e pelo método de perfuração em ágar.
- Determinar a menor concentração dos extratos capaz de inibir às cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705.

## 4. Metodologia

### 4.1. Coleta das amostras

As amostras de alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*) foram identificadas e coletadas pelo Professor e botânico Dr. Christopher William Fagg da Universidade de Brasília. As folhas de alecrim do campo foram coletadas no mês de novembro de 2015, na Fazenda Água Limpa da Universidade de Brasília, localizada no Park Way, Distrito Federal, Brasil. As folhas coletadas foram lavadas com água corrente e em seguida o material foi seco em temperatura ambiente e triturado em moinho de facas (Figura 4).



**Figura 4. Folhas secas e trituradas de *B. dracunculifolia*.**

### 4.2. Obtenção dos extratos

Para a preparação dos extratos foram utilizados os solventes etanol (solvente polar) e hexano (solvente apolar). A obtenção dos extratos foi feita por processo de extração a frio (maceração passiva) e para isso foi pesado em recipiente de vidro 100 g do material vegetal em pó e adicionado 1 litro de solvente (etanol ou hexano). As amostras foram mantidas em contato com os solventes (com homogeneizações diárias), por sete dias em temperatura ambiente e decorrido este período os extratos foram filtrados em papel filtro Whatman n°1e concentrados. As amostras foram concentradas em rotaevaporador (para eliminação dos solventes), com uso de percolador acoplado a vácuo em rotação de 90 rpm e temperatura máxima de 60°C

(Figura 5). Os extratos concentrados foram completamente secos em banho-maria a 45°C, até a eliminação completa do solvente. Foram obtidos então os extratos hexânico e etanólico. Os extratos foram diluídos com solução aquosa dimetilsulfóxido (DMSO) a 20% (v/v) e Tween 80 a 10% (p/v), com concentração final de 50 mg/mL (NADER,2010).



**Figura 5. Rotaevaporação dos solventes dos extratos de *B. dracunculifolia*.**

### **4.3. Obtenção do óleo essencial**

O óleo essencial foi obtido por meio de hidrodestilação por arraste a vapor em aparelho tipo Clevenger (Figura 6), pelo período de 2-3 horas. Foram utilizadas 100g de planta seca para cada 500mL de água destilada. Foram realizadas 4 destilações, utilizando-se 400 g de folhas secas de alecrim do campo para se obter a quantidade de óleo essencial necessário para os testes de atividade antimicrobiana. O óleo foi recolhido do aparelho tipo Clevenger para um béquer pequeno com pipeta de Pasteur e deixado em estufa de secagem a 40°C, por 24-48 h para evaporação completa do restante da água (PROBST,2012).



**Figura 6. Extração de óleo essencial de *B. dracunculifolia*.**

#### **4.4. Microrganismos avaliados**

Foram selecionadas 2 cepas de bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705. As cepas utilizadas foram cedidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), da Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ.

#### **4.5. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos e do óleo essencial pelo Método de Difusão em Disco**

Os inóculos foram preparados por meio de suspensão direta do crescimento microbiano em caldo LB com turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland ( $1,0 \times 10^6$  -  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL) sendo ajustada entre 0,08 – 0,10 de densidade óptica (D.O) a 625nm em espectrofotômetro. As culturas bacterianas diluídas foram semeadas na superfície de ágar Müller-Hinton. Para isso, 100  $\mu$ L de suspensão bacteriana foram espalhadas com alça de Drigalsky em placas de Petri contendo ágar Müller-Hinton. Para o teste da atividade antimicrobiana dos extratos, discos de papel de filtro autoclavados (10 mm) foram impregnados com 20  $\mu$ L dos extratos na concentração 50 mg/mL e adicionados sobre a superfície do ágar inoculado. Controles negativos foram realizados com 20  $\mu$ L de solução aquosa de DMSO 20% (v/v) e Tween 80 10% (p/v). Para o teste da atividade antimicrobiana do óleo

essencial, discos de papel de filtro autoclavados (10 mm) foram impregnados com 20  $\mu\text{L}$  do óleo essencial e adicionados sobre a superfície do ágar inoculado. Controles negativos foram realizados com 20  $\mu\text{L}$  de água estéril e também controles foram realizados com gentamicina (10  $\mu\text{g}$ ), norfloxacin (10  $\mu\text{g}$ ) e tetraciclina (30  $\mu\text{g}$ ). Os testes foram realizados em triplicata. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas a 37°C. Os halos de inibição do crescimento bacteriano foram medidos em milímetros com auxílio de uma régua milimetrada. Halos de inibição maiores que 7 mm foram considerados como resultados positivos (NASCIMENTO et al., 2000).

#### **4.6. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos e do óleo essencial pela técnica de perfuração em ágar**

Os inóculos foram preparados por meio de suspensão direta do crescimento microbiano em caldo LB com turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland ( $1,0 \times 10^6$  -  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL) sendo ajustada entre 0,08 – 0,10 de densidade óptica (D.O) a 625nm em espectrofotômetro. As culturas bacterianas diluídas foram semeadas na superfície de ágar Müeller-Hinton. Para isso, 100  $\mu\text{L}$  de suspensão bacteriana foram espalhadas com alça de Drigalsky em placas de Petri contendo ágar Müeller-Hinton. Na técnica de perfuração em ágar, a remoção do meio de cultura sólido é realizada com auxílio de cilindros de 6-8 mm de diâmetro para a formação de poços, nos quais é possível aplicação das substâncias a serem analisadas (OSTROSKY et al., 2008). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas a 37°C. Para o teste da atividade antimicrobiana dos extratos, os poços foram preenchidos com 20  $\mu\text{L}$  dos extratos na concentração 50 mg/mL e controles negativos foram realizados com 20  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de DMSO 20% (v/v) e Tween 80 10% (p/v). Para o teste da atividade antimicrobiana do óleo essencial, os poços foram preenchidos com 20  $\mu\text{L}$  do óleo essencial e controles negativos foram realizados com 20  $\mu\text{L}$  de água estéril. Os testes foram realizados em triplicata. Halos de inibição maiores que 7 mm foram considerados como resultados positivos (NASCIMENTO et al., 2000).

#### 4.7. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos pelo Método de Microdiluição em Caldo

O Método de Microdiluição em Caldo foi realizado de acordo com a descrição da CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2003). Os inóculos foram preparados com o crescimento das cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705 incubadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion). A concentração foi ajustada pela turbidez de 0,5 na escala de McFarland, apresentando aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/mL. Foram realizadas diluições das culturas em caldo Müeller-Hinton (caldo MH), com auxílio espectrofotômetro de densidade óptica (D.O) a 625nm resultando em uma concentração final de  $1 \times 10^6$  UFC/mL.

A concentração inicial dos extratos ultrafiltrados foi de 20mg/mL e a partir dessas concentrações foram feitas diluições sucessivas utilizando 100  $\mu$ L de extrato e 100  $\mu$ L de caldo Müeller-Hinton, sendo que as concentrações finais utilizadas nos testes foram 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,75; 0,38 e 0,19 mg/mL.

Os ensaios foram realizados em microplacas de ELISA, de fundo chato, em triplicata. Cada fração de extrato ultrafiltrada foi testada contra as duas cepas de bactérias. Cada poço recebeu 80  $\mu$ L de caldo Müeller-Hinton, 100  $\mu$ L de solução dos extratos e 20  $\mu$ L do inóculo ajustado para a concentração de  $1 \times 10^6$  UFC/mL, resultando em uma concentração final de  $1 \times 10^5$  UFC/mL, por poço. Cada poço apresentou um volume final de 200  $\mu$ L.

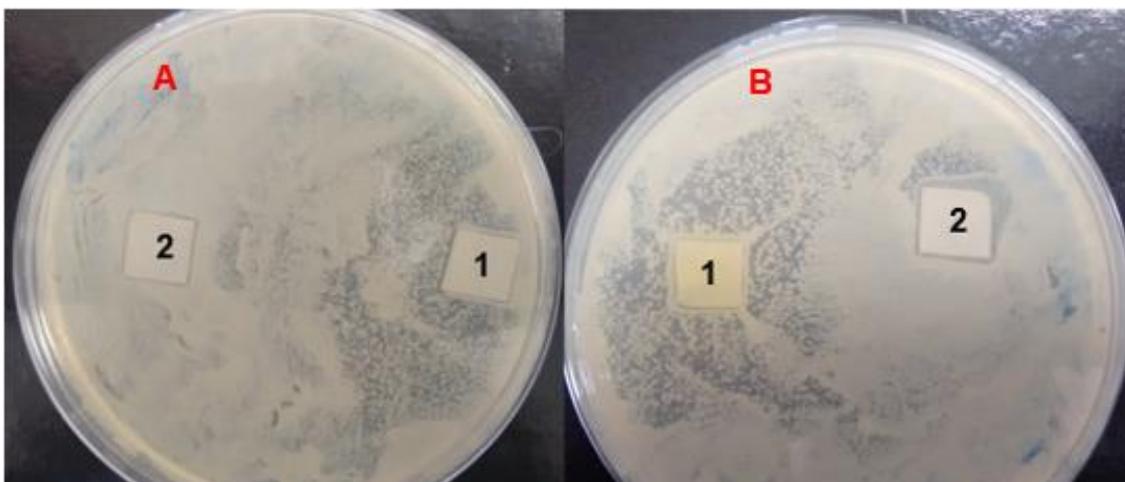
No controle negativo, cada poço recebeu 180  $\mu$ L de caldo MH e 20  $\mu$ L do inóculo na concentração de  $1 \times 10^6$  UFC/mL. Para evitar interferência de coloração dos extratos e do caldo MH, foi utilizado como branco 100  $\mu$ L de caldo MH e 100  $\mu$ L dos extratos.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37° C por 24 horas e o procedimento foi feito em triplicata. A leitura das placas foi realizada em leitora de microplaca Multiskan, com comprimento de onda de 630 nm.

## 5. Resultados e discussão

### 5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos hexânico e etanólico de *Baccharis dracunculifolia* pelo Método de Difusão em Disco

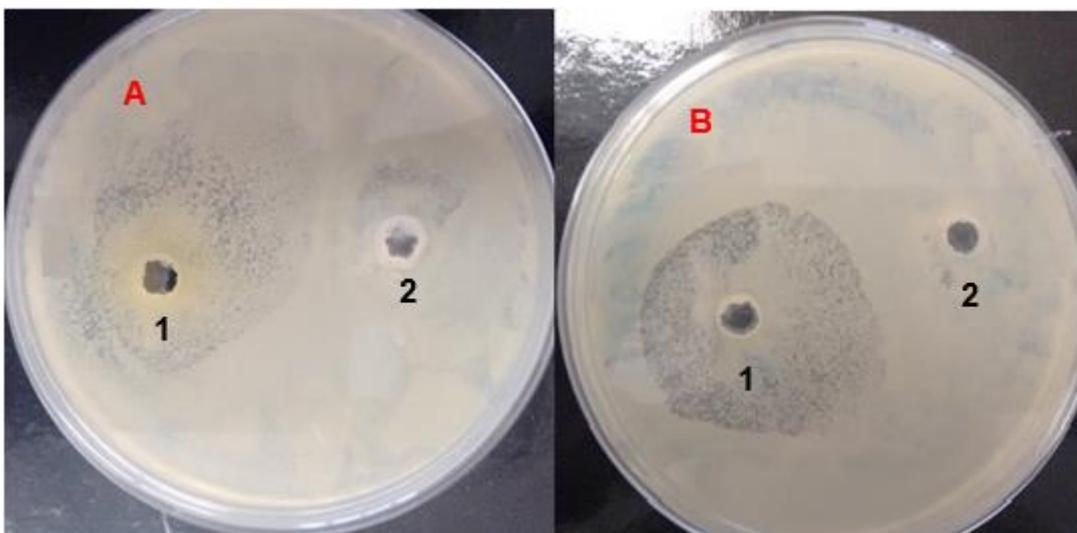
Os testes de difusão de disco não apresentaram resultados satisfatórios para inibição de crescimento bacteriano. Os halos observados não apresentaram inibição total, além de não serem bem definidos como observado na Figura 7. De acordo com Nader (2010), pode se inferir que pela estrutura de alto peso molecular das moléculas dos extratos etanólico e hexânico, as substâncias com atividade antimicrobiana não conseguiram se difundir do disco de papel para o ágar. Observou-se também que os controles negativos apresentaram certa inibição de crescimento bacteriano (Figura 7 B), pois a concentração de DMSO 20% (v/v) e Tween 80 10% (p/v) utilizada para solubilizar os extratos ficou elevada e apresentou toxicidade celular.



**Figura 7. Teste de Difusão de Disco para os extratos hexânico e etanólico de *Baccharis dracunculifolia*** – (A) placa com *S. aureus* (1) disco com 20  $\mu$ L de extrato hexânico e (2) disco com 20  $\mu$ L de solução de DMSO20% e Tween 80 10%. (B) placa com *S. aureus* (1) disco com 20  $\mu$ L de extrato etanólico e (2) disco com 20  $\mu$ L de solução de DMSO20% e Tween 80 10%.

## 5.2. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de *Baccharis dracunculifolia* pela técnica de perfuração em ágar

Na técnica de perfuração em ágar, os halos observados também não apresentaram inibição total, porém se mostraram mais bem definidos quando comparados à técnica de Difusão em Disco, como observado na Figura 8. Pode se entender que o método também não foi adequado para os tipos de extratos analisados, considerando o alto peso molecular dos componentes e a dificuldade de difusão das substâncias antimicrobianas para o ágar.



**Figura 8. Técnica de perfuração em ágar para os extratos hexânico e etanólico de *Baccharis dracunculifolia*** – (A) placa com *S. aureus* (1) disco com 20  $\mu$ L de extrato etanólico e (2) disco com 20  $\mu$ L de solução de DMSO20% e Tween 80 10%. (B) placa com *S. aureus* (1) disco com 20  $\mu$ L de extrato hexânico e (2) disco com 20  $\mu$ L de solução de DMSO20% e Tween 80 10%.

### 5.3. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* pelos Métodos de difusão em disco e de perfuração em ágar

O óleo essencial apresentou inibição sobre as cepas de *S. aureus* e de *K. pneumoniae*. A Tabela 1 apresenta os valores médios de diâmetro dos halos de inibição obtidos em 2 repetições pelo método de Difusão em Disco. A Tabela 2 apresenta os valores médios de diâmetro dos halos de inibição obtidos em 2 repetições pelo método de perfuração em ágar.

**Tabela 1. Halos médios de inibição (em mm) para o óleo essencial de *B. dracunculifolia* pelo método de Difusão em Disco**

<b>Microrganismo</b>	<b>Repetição 1</b>	<b>Repetição 2</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	22,3	20,6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24,0	25,0

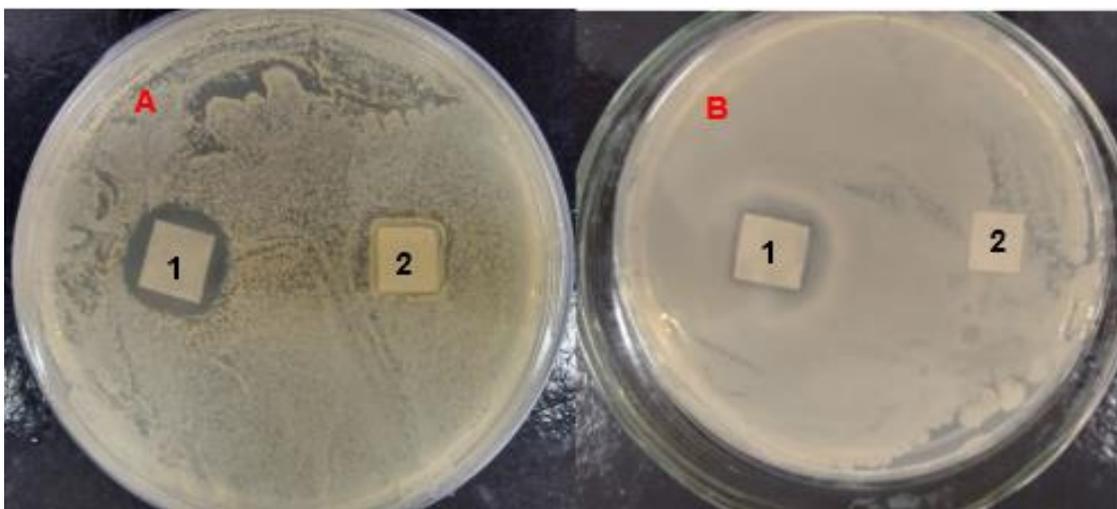
Os testes foram feitos em triplicata e os valores foram expressos como média.

**Tabela 2. Halos médios de inibição (em mm) para o óleo essencial de *B. dracunculifolia* pelo método de perfuração em ágar**

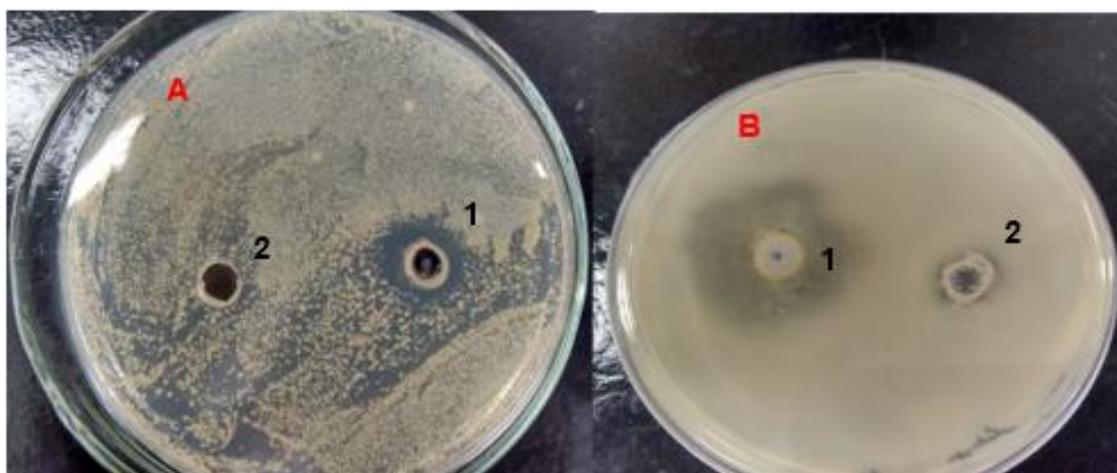
<b>Microrganismo</b>	<b>Repetição 1</b>	<b>Repetição 2</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	17,0	15,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17,0	16,0

Os testes foram feitos em triplicata e os valores foram expressos como média.

Neste estudo, os discos contendo 20  $\mu$ L de óleo essencial sem diluição apresentaram valores médios de halos de inibição de 20,6 a 22,6 mm para *Staphylococcus aureus* e valores médios de halos de inibição de 24 a 25 mm para *Klebsiella pneumoniae* pelo método de Difusão em Disco (Figura 9). A Figura 10 apresenta os halos de inibição para *S. aureus* e os halos de inibição para *K. pneumoniae* pelo método de perfuração em ágar.



**Figura 9. Teste de Difusão em Disco para o óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia*** – (A) placa com *S. aureus* (1) disco com 20  $\mu$ L de óleo e (2) disco com 20  $\mu$ L de água destilada. (B) placa com *K. pneumoniae* (1) disco com 20  $\mu$ L de óleo e (2) disco com 20  $\mu$ L de água destilada



**Figura 10. Teste de perfuração em ágar para o óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia*** – (A) placa com *S. aureus* (1) poço com 20  $\mu$ L de óleo e (2) poço com 20  $\mu$ L de água destilada. (B) placa com *K. pneumoniae* (1) poço com 20  $\mu$ L de óleo e (2) poço com 20  $\mu$ L de água destilada

Resultados parecidos com esse estudo foram reportados por Ferronato et al. (2007) e Piantino (2008) para inibição do crescimento de cepas de *Staphylococcus aureus* com uso de óleo essencial de alecrim do campo.

No estudo de Ferronato et al. (2007) a capacidade antibacteriana do óleo essencial de *B. dracunculifolia* coletado na região Sudoeste do Estado do Paraná foi avaliado pelo método de difusão em disco de papel, em placas de Petri contendo meio de Müller-Hinton, semeadas com suspensões bacterianas de 3 cepas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Os discos contendo diferentes volumes do óleo essencial sem diluição (1, 3, 5 e 10 µL/disco) foram adicionados às placas e incubados a 36°C por 24 a 48 horas. Os resultados revelaram que o óleo apresentou atividade antimicrobiana sobre *S. aureus* e *E. coli*. Os halos de inibição do crescimento de *E. coli* mostraram variações entre 9,25 mm para 1 µL a 13,62 mm para 10 µL do óleo adicionado aos discos. Para *S. aureus* essa variação foi de 8,35 mm para 1µL a 14,63 mm para 10 µL. Este óleo apresentou uma baixa atividade inibitória sobre *P. aeruginosa*, sendo que para os volumes de 1, 3 e 5 µL a bactéria se mostrou resistente. Apenas para 10 µL foi verificado sensibilidade com formação de um halo de inibição de 8,32 mm.

No trabalho de Piantino (2008), foi estudada a extração de compostos fenólicos de alecrim do campo com dióxido de carbono supercrítico. Na atividade antimicrobiana realizada por difusão de disco, dentre os microrganismos testados (*S. aureus*, *E. coli*. e *C. albicans*), apenas o *S. aureus* apresentou inibição do crescimento com halos ao redor de 9 mm. Os extratos supercríticos e alcoólicos não apresentaram atividade frente a *C. albicans* e *E. coli*.

No caso de *S. aureus*, de acordo com NCCLS (2016), os halos de interpretação de antibiograma usando gentamicina (10 µL) são: maior que 15 mm sensível, 13-14 mm intermediário e menor que 12 mm resistente. Para tetraciclina (30 µL) os halos de interpretação de antibiograma para *S. aureus* são: maior que 19 mm sensível, 15-18 mm intermediário e menor que 14 mm resistente. Para norfloxacin (10 µL) os halos de interpretação de antibiograma para *S. aureus* são: maior que 17 mm sensível, 13-16 mm intermediário e menor que 12 mm resistente. Neste trabalho, o halo de inibição de *S. aureus* ATCC 29213 para 20 µL de óleo essencial de alecrim do campo apresentou valor médio de 20,6 a 22,6 mm para o método de difusão em disco, indicando sensibilidade dessa cepa a essa concentração desse composto.

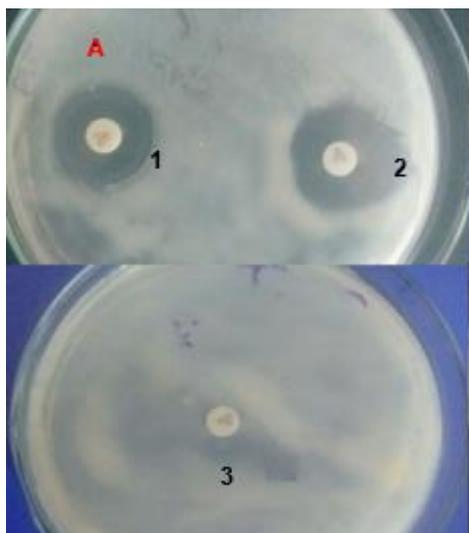
A tabela 3 apresenta os valores médios de diâmetro dos halos de inibição dos antibióticos: gentamicina, norfloxacin e tetraciclina, obtidos para *K. pneumoniae*.

**Tabela 3. Halos médios de inibição (em mm) para os antibióticos gentamicina, norfloxacina e tetraciclina**

<b>Microrganismo</b>	<b>Gentamicina</b>	<b>Norfloxacina</b>	<b>Tetraciclina</b>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25,0± 0,01	Sem halo	15,0 ± 0,01

Os testes foram feitos em triplicata e os valores foram expressos como média e desvio padrão.

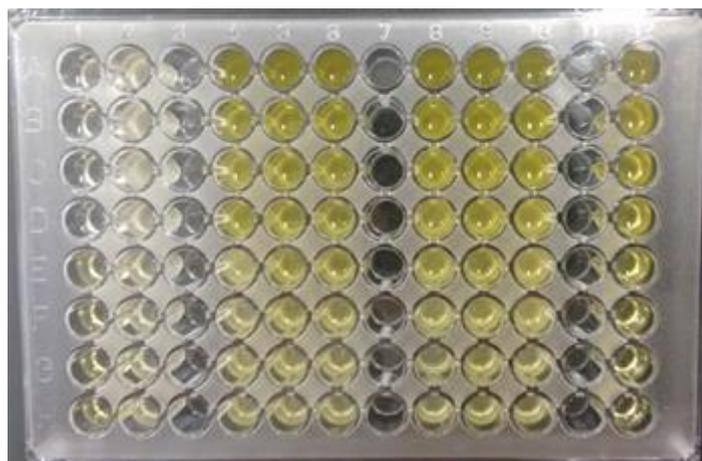
A comparação dos resultados obtidos para óleo de *B. dracunculifolia* em relação aos discos de antibióticos mostraram que o halo de inibição do óleo foi maior que os halos de inibição de gentamicina, norfloxacina e tetraciclina para *K. pneumoniae*. De acordo com NCCLS (2016) os halos de interpretação de antibiograma para *K. pneumoniae* usando gentamicina (10 µL) são: maior que 15 mm sensível, 13-14 mm intermediário e menor que 12 mm resistente. Para tetraciclina (30 µL) os halos de interpretação de antibiograma para *K. pneumoniae* são: maior que 19 mm sensível, 15-18 mm intermediário e menor que 14 mm resistente. Assim, o halo de inibição de *K. pneumoniae* para o óleo apresentou valor médio de 24 - 25 mm para o método de difusão em disco, indicando sensibilidade dessa cepa a essa concentração desse composto e para os antibióticos a *K. pneumoniae* apresentou sensibilidade para gentamicina, resistência para norfloxacina e sensibilidade intermediária para tetraciclina (Figura 11).



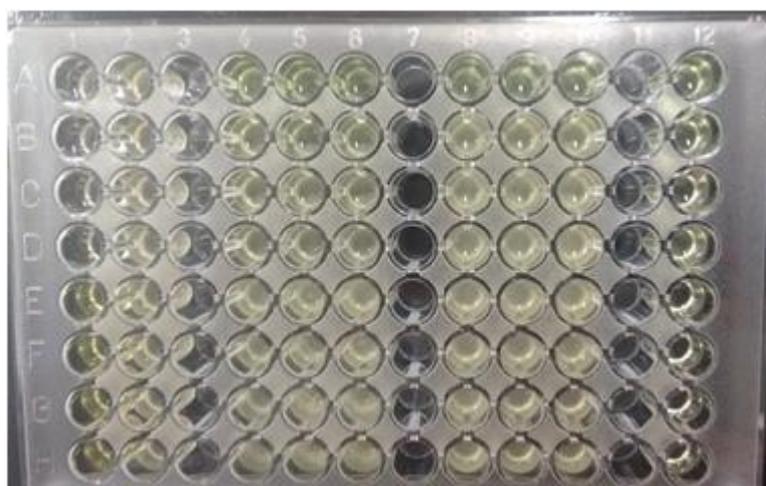
**Figura 11. Teste de difusão em disco com antibióticos de referência.** (A) placa com *K. pneumoniae* (1) disco contendo tetraciclina (30  $\mu$ L), (2) disco de gentamicina (10  $\mu$ L) e (3) disco de norfloxacin (10 $\mu$ L).

#### **5.4 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos hexânico e etanólico de *Baccharis dracunculifolia* pelo método de microdiluição em caldo**

No método de microdiluição em caldo, os extratos hexânico e etanólico de *Baccharis dracunculifolia* apresentaram atividade antimicrobiana. Os valores de inibição do crescimento bacteriano foram comparados com o controle negativo e foram obtidos por leitura em leitora de microplaca Multiskan, com comprimento de onda de 630 nm (Figuras 12 e 13).



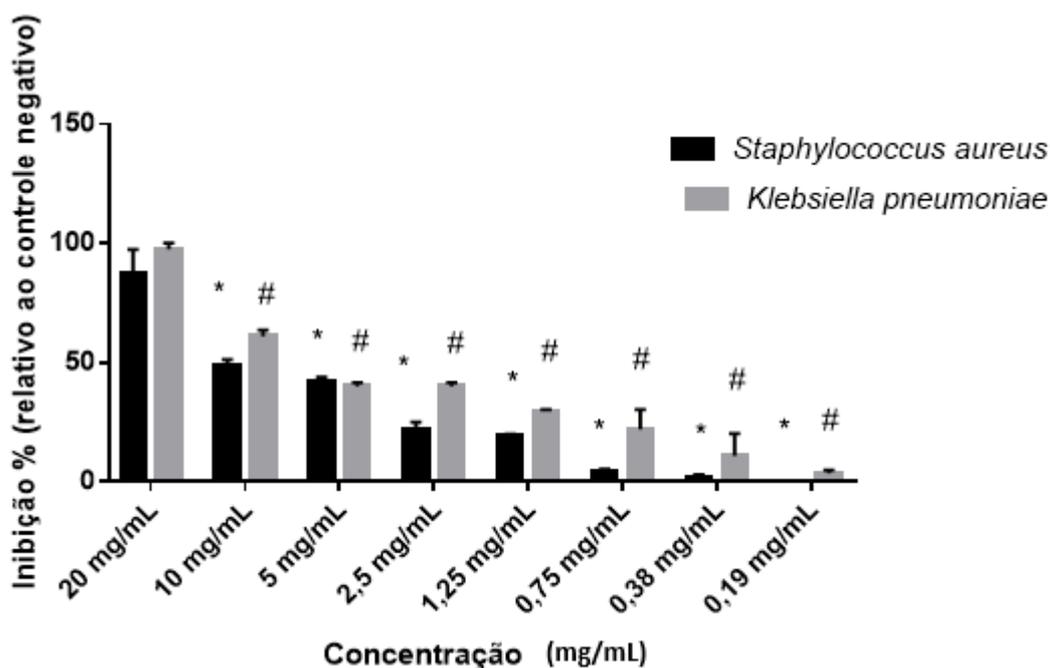
**Figura 12. Método de microdiluição em caldo utilizando o extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia***



**Figura 13. Método de microdiluição em caldo utilizando o extrato hexânico de *Baccharis dracunculifolia***

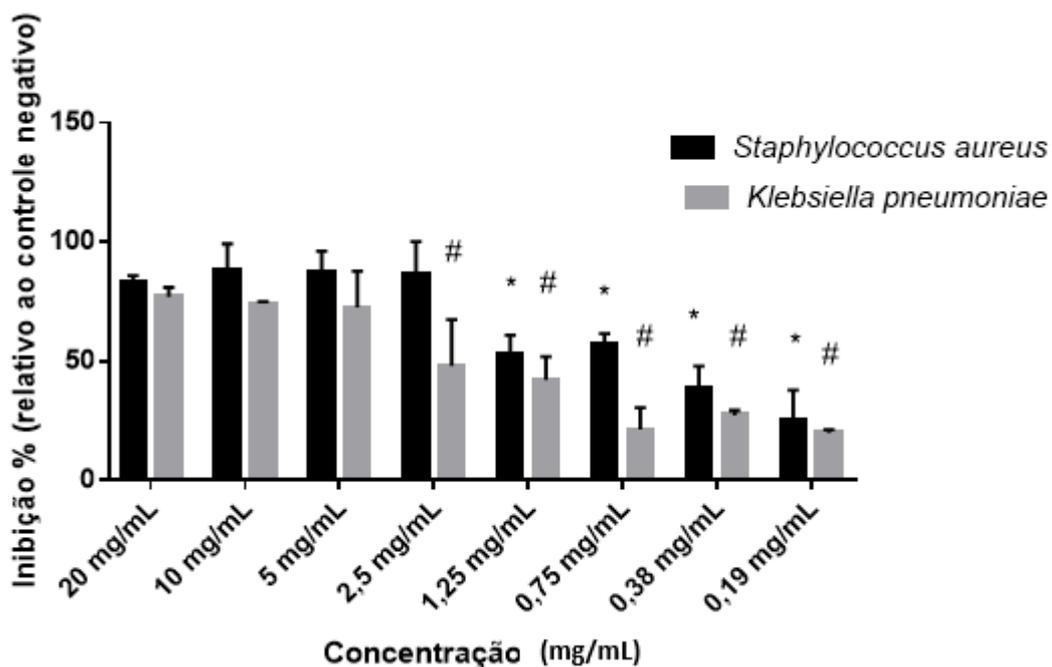
O Gráfico 1 demonstra os valores encontrados para a inibição de crescimento bacteriano resultante do tratamento com diferentes diluições do extrato hexânico de alecrim do campo em relação ao controle negativo, que consistiu de caldo MH e inoculo das bactérias em teste. As barras representam as médias da inibição de crescimento de acordo com o microrganismo e as diferentes concentrações de extrato. Os valores marcados por (\*) e (#) representam aqueles que foram estatisticamente diferentes do valor da maior concentração (20mg/mL). Ao observar o gráfico é possível concluir que houve inibição significativa de mais de 50% nas concentrações de 20 e 10mg/mL de extrato hexânico, tanto para *S. aureus* quanto

para *K. pneumoniae*. Todos os valores foram estatisticamente diferentes do valor da concentração de 20mg/mL.



**Gráfico 1. Inibição de crescimento bacteriano em relação ao controle negativo obtido pelo método de microdiluição em caldo utilizando o extrato hexânico de *Baccharis dracunculifolia***

O Gráfico 2 demonstra os valores encontrados para a inibição de crescimento bacteriano resultante do tratamento com extrato etanólico de alecrim do campo em relação ao controle negativo. Ao observar o gráfico podemos concluir que houve inibição significativa de mais de 50% nas concentrações de 20, 10, 5 e 2,5mg/mL de extrato etanólico tanto para *S. aureus* quanto para *K. pneumoniae*. Os valores só foram estatisticamente diferentes da maior concentração de 20mg/mL a partir de 2,5mg/mL para *K. pneumoniae* e de 1,25mg/mL para *S. aureus*.



**Gráfico 2.** Inibição de crescimento bacteriano em relação ao controle negativo obtido pelo método de microdiluição em caldo utilizando o extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia*

Nader (2010) fez o teste das concentrações inibitórias mínimas dos extratos metanólico, clorofórmico e hexânico, preparados a partir das folhas de *Baccharis dracunculifolia* na concentração de 10 mg/mL. Os extratos metanólico e clorofórmico inibiram a multiplicação de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a partir de 0,5 mg/mL. O extrato hexânico, embora não tenha inibido a multiplicação de *S. aureus* ATCC 25923, atuou sobre 45% das cepas de *S. aureus* isoladas de campo, com concentração inibitória mínima de 10 mg/mL. Soares et al. (2013) obtiveram concentração inibitória de 1,5 mg/mL para o extrato hidroalcoólico de *B. dracunculifolia* testado em cepas de *S. aureus*.

## 6. Conclusão

No método de microdiluição em caldo, os extratos hexânico e etanólico de *Baccharis dracunculifolia* apresentaram atividade antimicrobiana para as cepas de *S. aureus* e de *K. pneumoniae*. Para a avaliação de potencial de atividade antimicrobiana dos extratos de alecrim do campo, o método de microdiluição em caldo mostrou-se mais adequado que o método de difusão em disco.

O óleo essencial de alecrim do campo apresentou inibição sobre as cepas de *S. aureus* e de *K. pneumoniae*. Os discos contendo 20 µL de óleo essencial sem diluição apresentaram valores médios de halos de inibição 20,6 a 22,6 mm para *S. aureus* e valores médios de halos de inibição de 24 a 25 mm para *K. pneumoniae* pelo método de difusão em disco. Esses valores ficaram maiores que os halos de interpretação de antibiograma usando gentamicina, norfloxacin e tetraciclina, indicando sensibilidade dessas bactérias ao óleo essencial de alecrim do campo.

Nos estudos futuros são necessários testes de citotoxicidade celular e fracionamentos dos extratos com identificação dos compostos antimicrobianos.

Considerando os resultados obtidos, o alecrim do campo oriundo do Cerrado pode ser considerado uma espécie promissora para o desenvolvimento de fármacos antimicrobianos.

## 7. Referências bibliográficas

AGOSTINI, F.; SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; PANSERA, M. R.; ZATTERA, F.; WASUM, R.; SERAFINI, L. A. Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V 15, n. 3, p.215-220, 2005.

ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L.; PAREDES-GUZMAN, J. Chemical composition of *Baccharis dracunculifolia*, the botanical source of propolis from the states of São Paulo and Minas Gerais, Brazil. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 909-915, 2005.

ALMEIDA, L. F. R. et al. Composição do óleo essencial de rubim (*Leonurus sibiricus* L. Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 1, p. 35-38, 2005.

ARRUDA, D. C.; D'ALEXANDRI, KATZIN, A. M.; ULIANA, S. R. B. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1679-1687, 2005.

BASTOS, E. M. A. F. **Origem botânica e indicadores de qualidade da “própolis verde” produzida no Estado de Minas Gerais, Brasil**. 2001. 137 f. Tese (Doutorado em Entomologia), Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.

BEN-DAVID, D. et al. Outcome of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections, **Clinical Microbiological Infection**, v. 18, p. 54–60, 2011.

BENOIT, S. R. Community strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* as potential cause of healthcare-associated infections, Uruguay, 2002-2004. **Emerging Infectious Diseases**. v.14, n.8. p. 1216-1222, 2008.

BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R.; SANTOS, C. A., M.; FARAGO, P. V.; MATZENBACHER, N. I. O progresso da pesquisa sobre o gênero *Baccharis*,

Asteraceae: Estudos botânicos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, n. 3, p. 268-271, 2005.

CASSEL, E.; FRIZZO, C. D.; VANDERLINDE, R.; ATTI-SERAFINI, L.; LORENZO, D.; DELLACASSA, E. Extraction of *Baccharis* oil by supercritical CO<sub>2</sub>, **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 39, p. 4803-4805, 2000.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. v. 23, n. 2. 6 ed. Approved standard M7-A6. 2003.

FABIANE, K. C.; FERRONATTO, R.; SANTOS, A. C.; ONOFRE, S. B. Physicochemical characteristics of the essential oils of *Baccharis dracunculifolia* and *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae), **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n. 2, p.197-203, 2008.

FERRONATTO, R. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 224-230, 2007.

FLORÃO, A. et al. Essential oils from *Baccharis* species (Asteraceae) have anti-inflammatory effects for human cells. **Journal of Essential Oil Research**, v. 24, n. 6, p. 561-570, 2012.

FONSECA, M. C. M. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos vegetais sobre fungos fitopatogênicos. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. S6169-S 6176, 2012.

FUKUDA, M. et al. Studies on the constituents of the leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and their cytotoxic activity. **Pharmaceutical Society of Japan**, v. 54, n.10, p. 1465-1468, 2006.

GALVÃO, L. C. D. et al. Antimicrobial activity of essential oils against *Streptococcus mutans* and their antiproliferative effects. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, n. 1, p. 1-12, 2012.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. D. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v. 15, n. 8, p. 639-652, 2008.

JACOBY, T.S. ; KUCHENBECKER, R.S. ; DOS SANTOS, R.P. ; MAGEDANZ, L. ; GUZATTO, P. ; MOREIRA, L.B. Impact of hospital-wide infection rate, invasive procedures use and antimicrobial consumption on bacterial resistance inside an intensive care unit, **Journal of Hospital Infection**, v. 75, n. 1, p. 23 -27, 2009.

KIMOTO, T.; KOYA, S.; HINO, K.; MICALLEF, J.; HANAYA, T.; ARAI, S.; IKEDA M.; KURIMOTO, M. Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by Brazilian propolis and Artepillin C. **VirchowsArchives**, v. 438, p. 259-270, 2001.

LEMOS, M., et al. *Baccharis dracunculifolia*, the main botanical source of Brazilian green propolis, displays antiulcer activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.59, p.603-608, 2007.

LIMBERGER, R. P. et al. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 916-919, 2004.

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.

MASSIGNANI, J. J. et al. Antiulcerogenic Activity of the Essential Oil of *Baccharis dracunculifolia* on Different Experimental Models in Rats. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 10, p. 1355–1360, 2009.

MAULDIN, P. D.; SALGADO, C. D.; HANSEN, I. S. J; DURUP, D. T.; BOSSO, J. A. Attributable hospital cost and length of stay associated with health care-associated infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p.109-115, 2010.

MEDEIROS, F. C. M. **Caracterização química e atividade biológica de óleos essenciais de plantas do Cerrado contra fungos xilófagos**. 108 p., Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, 2014.

MELO, S. F. et al. Effect of the *Cymbopogon citratus*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the stannous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. **Mutation Research**, v. 496, p. 33-38, 2001.

MENEZES, H. Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato aquoso de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v.72, p.1-64, 2005.

MISSIMA, F. et al. Effect of *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) extracts and its isolated compounds on macrophage activation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, p.463-468, 2007.

NADER, T. T. et al. **Potencial de atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos vegetais do cerrado frente estirpes de *Staphylococcus aureus***, Dissertação (Mestrado), UNESP, Jaboticabal, 2010

NAKAJIMA, J. et al. **Asteraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB55>). Acesso em: 03.05.2016.

NAKANISHI, I. et al. Efficient radical scavenging ability of artepillin C, a major component of Brazilian propolis, and the mechanism. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v.1, p.1452-1454, 2003.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p. 247-256, 2000.

NCCLS -Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana - 2016. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicos/audite/manuais/clsi/clsi\\_OPASM100S15.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicos/audite/manuais/clsi/clsi_OPASM100S15.pdf). Acesso em: 10 de Maio de 2016.

NUNES, F. M. N.; PEREIRA, P. A. P.; ANDRADE, J. B. Reações de ozonólise de olefinas em fase gasosa, **Química Nova**, v. 23, n. 6, p. 795-804, 2000.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PARK, Y. K; PAREDES-GUZMAN, J. F.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1100-1103, 2004.

PARREIRA, N. A. et al. Antiprotozoal, schistosomicidal and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemical and Biodiversity**, v. 7, n. 4, p. 993-1001, 2010.

PAULINO, N. et al. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, v. 587, p. 296-301, 2008.

PIANTINO, C. R. **Extração de compostos fenólicos de alecrim-do-campo (*Bacchari dracunculifolia*) com dióxido de carbono supercrítico**, 99 p., Dissertação (Mestrado), UNICAMP, 2008.

PROBST, I. S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2012.

RODRIGUEZ, Carlos Andrés; VESGA, Omar. Staphylococcus aureus resistente a vancomicina. **Biomédica**, Bogotá, v. 25, n. 4, p. 575-587, Dec. 2005.

SANTOS, R. F. **Produção de fitomassa, teor e composição química do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. em função da adubação orgânica**, 67 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2011.

SHIMIZU, K.; SWADESH, K. D.; HASHIMOTO, T.; SOWA, Y.; YOSHIDA, T.; SAKAI, T.; MATSUURA, Y.; KANAZAWA, K. Artepillin C in Brazilian propolis induces G0/G1 arrest via stimulation of Cip1/p21 expression in human colon cancer cells, **Molecular Carcinogenesis**, v. 44, p. 293-299, 2005.

SILVA, S. M. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana de espécies vegetais do bioma Cerrado**. 2013. 113 f., Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

SOARES, K.; RESENDE, A.; PANDOLFO, C. SILVA JÚNIOR, W.; Avaliação da atividade antimicrobiana de extrato de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) sobre bactérias gram negativas e gram positivas. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 17, n. 4, p. 17-28, 2013.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8ª. Porto Alegre. 2005.

UTO Y. A.; HIRATA, T.; FUYITA, T.; SYUNSUKE, H.; NAGASAWA, H.; HORI, First Total synthesis of artepillin C established by *o*, *o'*-Diprenylation of *p*-halophenols in water. **Journal of Organic Chemistry**, v. 67, n. 7, p. 2355 -2357, 2002.

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

YIGIT, H. et al. Novel carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, kpc-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumonia*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p.1151, 2001.

ZUO, G.; WANG, G.; ZHAO, Y.; XU, G.; HAO, X.; HAN, J.; ZHAO, Q. Screening of Chinese medicinal plants for inhibition against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 287-290, 2008.