Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Alpinia zerumbet*

Giovanna Santana Ruiz[1], Karolina Marie Alix Benedictte Van Sebroeck Dória[1]

[1]Centro Universitário Módulo,
e-mails: ruizgiovanna07@gmail.com, karolina.doria@modulo.edu.br.

Resumo
Os óleos essenciais são compostos aromáticos produzidos pelo metabolismo secundário das plantas com a finalidade de proporcionar mecanismos de defesas contra o ataque de pragas e doenças. O objetivo deste estudo foi verificar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* frente a *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica*. Para este estudo foram realizadas extrações do óleo essencial através da destilação por arraste a vapor utilizando o aparelho de Clevanger. Os testes de avaliação microbiológica dos óleos essenciais foram realizados através de ensaio de disco-difusão frente as espécies *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica*. Houve ação antimicrobiana do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* quando comparada com o controle positivo (discos de antibióticos padrões) ampicilina (10 µg/disco), cloranfenicol (30 µg/disco) e oxacilina (1 µg/disco) indicando atividade equivalente à 44,4%; 63,16% e 92,31% frente à *Staphylococcus aureus* e 66,67%, não inibiu e 85,71% frente à *Salmonella enterica.*

Palavras-chave: *Salmonella enterica*. *Staphylococcus aureus*. Suscetibilidade bacteriana.

Abstract

Essential oils are aromatic compounds produced by the secondary metabolism of plants in order to provide defense mechanisms against attacks by pests and diseases. The aim of this study was to verify the antimicrobial activity of Alpinia zerumbet essential oil against Staphylococcus aureus and Salmonella enterica. For this study, the essential oil was extracted by steam distillation using the Clevanger apparatus. The microbiological evaluation of the essential oils was carried out using a disc diffusion test against the species Staphylococcus aureus and Salmonella enterica. Alpinia zerumbet essential oil showed antimicrobial action when compared to the positive control (standard antibiotic disks) ampicillin (10 µg/disk), chloramphenicol (30 µg/disk) and oxacillin (1 µg/disk), showing activity equivalent to 44,4%, 63,16% and 92,31% against Staphylococcus aureus and 66,67%, did not inhibit and 85,71% against Salmonella enterica.

Key-words: *Salmonella enterica. Staphylococus aureus.* Antimicrobial susceptibility.

Introdução

A pesquisa de medicamentos derivados de plantas tornou-se promissora nos últimos anos e também uma alternativa melhor do que a medicina sintética e terapêutica. Os compostos naturais bioativos isolados de várias partes da planta são um impulso de pesquisa para diferentes profissionais, a saber, médicos, químicos e farmacêuticos.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) quase 21.000 plantas são utilizadas como medicinais em todo o mundo, sendo a Índia o maior produtor de ervas medicinais que atende as necessidades dos fitoterápicos (Seth e Sharma, 2004). Atualmente, produtos de origem vegetal têm sido utilizados como agentes antibacterianos. *Alpinia zerumbet*

é cultivada em regiões tropicais e subtropicais e tem sido explorada pela medicina tradicional (Weerapreeyakul *et al.,* 2019).

A colônia (*Alpinia zerumbet)*, pertence à família Zingiberaceae, foi morfologicamente caracterizada por Albuquerque e Neves (2004) como uma planta herbácea, perene, podendo atingir em média 2,5m altura, apresentando rizomas, com caule aéreo curto, folhas lanceoladas em disposição dística, de base aguda e ápice cuspidado, pubescentes nos bordos.

Esta espécie tem sido estudada e existem vários relatos de seu potencial de bioatividade com efeitos anti-inflamatórios, analgésicos, antialérgicos e neuroprotetores (Gosh e Rangan, 2013) e com atividade antimicrobiana (Victorio et al., 2009).

O óleo essencial de *Alpinia zerumbet* inclui monoterpenos, monoterpenos oxigenados e sesquiterpenos oxigenados (Van et al., 2021). A composição fitoquímica exclusiva do óleo essencial do rizoma desta espécie incluem o acetato de exofenquilo, o acetato de endofenquilo e o endofenchol identificados junto com outros compostos bioativos, como 5,6-desidrokawaína (DK), dihidro-6,6-desidrokawaína (DDK), eucaliptol, cânfora, β-pineno, linalol, mirceno, cinamato de metila, entre outros. Tais componentes foram validados por pesquisas *in vitro* e in vivo como sendo radioprotetores, antimicrobianos e anti-hipertensivos (Ghosh e Rangan, 2013, Chan et al., 2017, Bhatt et al., 2021)

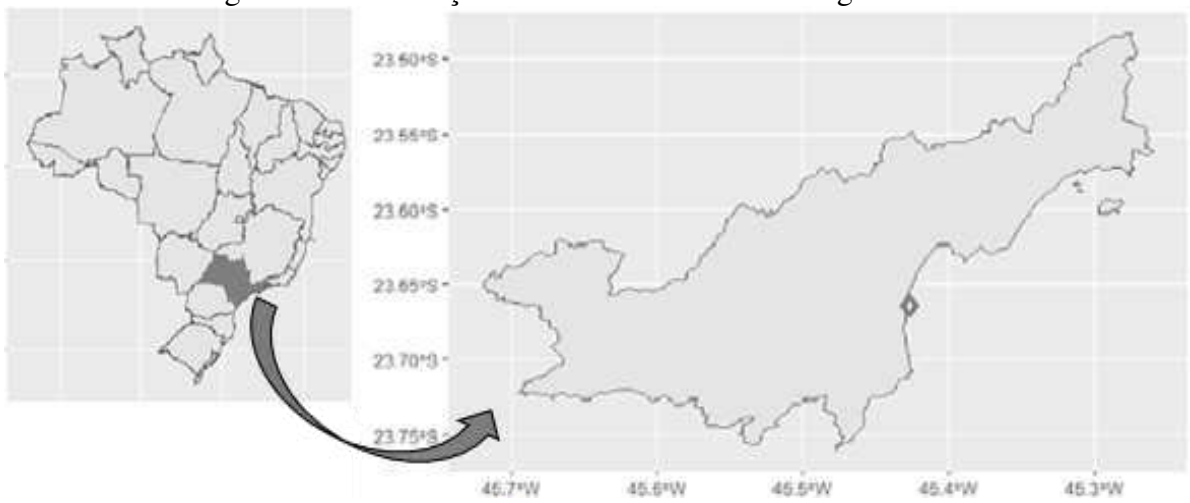
É evidente a necessidade de aumentar a quantidade de pesquisas e descobertas relacionadas a novas plantas aromáticas produtoras de óleos essenciais. Além disso, os microrganismos estão cada dia mais resistentes aos antimicrobianos existentes no mercado. Destaca-se a importância de caracterizar perfis de novos compostos que possuam atividade antimicrobiana, principalmente contra as bactérias que apresentam elevada resistência como *Samonella chlorasuis, Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Gutierrez *et al.*, 2008).

O objetivo deste estudo foi verificar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* frente a *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica*.

Metodologia

O material botânico foi coletado no município de Caraguatatuba, cidade pertencente ao Vale do Paraíba e localizada no litoral norte do estado de São Paulo e está situada nas coordenadas 23°37’12” de latitude sul e 45° 24’ 46” de longitude oeste (figura 1).

Figura 1 – Localização da área de estudo em Caraguatatuba – SP.



Fonte: elaborado pelos autores no RStudio

Foram coletados folhas, flores e rizomas da *Alpinia zerumbet*, levados ao Laboratório Multidisciplinar do Centro Universitário Módulo (Figura 2).

Figura 2 – Material botânico de *Alpinia zerumbet*



Legenda: A) Folha; B) Flor e C) Rizoma.
Fonte: Autores

O método utilizado para obtenção do óleo essencial foi a extração via destilação a vapor, utilizando o aparelho de Clevenger com capacidade de 1 litro, por um período de 2 horas, conforme metodologia descrita pela Farmacopeia Brasileira (2019). O óleo essencial resultante foi recolhido e armazenado em frasco âmbar sob refrigeração.

Para o ensaio de suscetibilidade antimicrobiana, foi empregado o meio de cultura Agar Mueller Hinton e água peptonada, sendo estes preparados de acordo com a recomendação do fabricante. O Agar Mueller Hinton, foi preparado e autoclavado à 121°C por 15 minutos. Assim que ocorreu seu resfriamento (50°C) procedeu-se o plaqueamento em câmara de fluxo laminar em condição asséptica. A água peptonada foi preparada e envazada nos tubos de ensaio e esterilizados em autoclave à 121°C por 15 minutos.

Os inóculos das bactérias foram preparados na água peptonada. Utilizou-se as cepas de *Staphylococcus aureus* LB25923 e *Salmonella enterica* BFC843 o seguindo o padrão 0,50 de McFarland.

Os discos (6 mm de diâmetro) foram acondicionados em placa de Petri estéril e foram esterilizados em autoclave à 121°C por 30 minutos. Para cada ensaio de disco-difusão foram realizados a adição de 2 discos com diferentes concentrações de óleo essencial (5 e 10 µl), os padrões positivos para o controle da bactéria, ou seja, os antibióticos cloranfenicol (CLO 30 µg/disco), ampicilina (AMP 10 µg/disco) e oxacilina (OXA 1 µg/disco) e o controle negativo (apenas o disco esterilizado). Os discos foram utilizados nos ensaios de avaliação da suscetibilidade microbiana pela técnica de disco difusão.

Com o auxílio de uma micropipeta foram inoculadas 500 µl da suspensão do inóculo. Este foi uniformemente distribuído por toda a superfície da placa de Petri contendo o meio de cultura Agar Mueller Hinton. Após este procedimento, foram adicionados sobre a placa de Petri os discos contendo os controles positivo, negativo e contendo o óleo essencial. As placas foram incubadas 37°C por 24 horas para a observação da presença dos halos de inibição, para a avaliação do óleo como agente antibacteriano. Os halos de inibição foram medidos com o auxílio de paquímetro.

Resultados

Foram adicionados ao balão volumétrico 239,17g da polpa dos rizomas já ralados e picados em pequenos cubos afim de facilitar a extração. Após a extração coletou-se 200 µl de óleo essencial, proporcionando um rendimento de extração 0,84 µl/g.

Nesta pesquisa, o óleo de *A. zerumbet* apresentou halo de inibição no ensaio de disco difusão na concentração de 5 µl/disco frente à *Staphylococcus aureus* de 12 mm, mesmo valor observado para a *Salmonella enterica* conforme tabela 1.

Tabela 1 – Medida do halo de inibição em milímetro (mm) no teste de suscetibilidade antimicrobiana utilizando a metodologia de disco-difusão.

Agente antimicrobiano		***Salmonella enterica* (mm)**	***Staphylococcus aureus* (mm)**
Óleo essencial	*Alpinia zerumbet*	12	12
Antibiótico	Ampicilina (10 µg/disco)	18	27
	Cloranfenicol (30 µg/disco)	NI	19
	Oxacilina (1 µg/disco)	14	13

Legenda: NI: Não inibiu.
Fonte: o autor.

Comparando a ação antimicrobiana do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* com o controle positivo (discos de antibióticos padrões) ampicilina (10 µg/disco), cloranfenicol (30 µg/disco) e oxacilina (1 µg/disco) houve atividade equivalente à 44,4%; 63,16% e 92,31% frente à *Staphylococcus aureus* e 66,67%, não inibiu e 85,71% frente à *Salmonella enterica.*

Discussão

A procura por elementos de interesse biológico e organoléptico aliados à valorização de espécies nativas podem fomentar a conservação dos recursos genéticos locais, bem como gerar agregação de valor a produtos naturais. Além disso, segundo Silva et al. (2020), um dos maiores problemas globais atualmente na saúde pública é a Resistência a Antimicrobianos (AMR). Por isso, é crescente a busca por agentes terapêuticos inovadores, com intuito de suprir a resistência dos patógenos aos produtos existentes no mercado.

De acordo com o estudo de Viana et al. (2020), o óleo essencial de *A. zerumbet,* também testado pelo método de Concentração Mínima Inibitória, foi altamente efetivo contra cepas da bactéria gram-positiva *Corynebacterium ulcerans.*

Indrayan, Tyagi e Agrawal (2010) extraíram óleo essencial do rizoma de *A. zerumbet* e verificaram a atividade inibitória moderadamente boa contra *Streptococcus mutans, Bacilus subtilis, Micrococcus luteus, Staphylococcus aureus e Salmonella typhi*. Os autores atribuem tais efeitos à composição do óleo, que apresenta tepien-4-ol, 1,8-cineol e γ-cadinol como principais compostos presentes, os quais também são conhecidos por sua ação antisséptica, anti-inflamatória e antibacteriana. Os resultados desta pesquisa vão ao encontro com os apresentados por estes autores, indicando que mesmo ocorrendo em área litorânea com elevado volume pluviométrico, as propriedades antimicrobianas são mantidas no óleo essencial proveniente deste local.

As atividades antimicrobianas atribuídas à *Alpinia zerumbet* estão associadas à presença de flavonoides (rutina e 3-O-glicosil-campferol) e ao monoterpeno 4-terpineol, sendo este o principal componente do óleo essencial (Luz et al, 1984).

Conclusão

Nesta pesquisa, o óleo de *A. zerumbet* apresentou halo de inibição na concentração de 5 µl/disco frente à *S. aureus,* apresentando um halo de inibição médio de 12 mm, mesmo valor observado para a *Salmonella enterica.* Ao comparar a ação antimicrobiana do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* com o controle positivo (discos de antibióticos padrões) ampicilina (10 µg/disco), cloranfenicol (30 µg/disco) e oxacilina (1 µg/disco) houve atividade equivalente à 44,4%; 63,16% e 92,31% frente à *Staphylococcus aureus* e 66,67%, não inibiu e 85,71% frente à *Salmonella enterica.* Portanto, este estudo caracteriza o óleo essencial da Colônia como um agente promissor na área de antimicrobianos de origem natural, evidenciando a necessidade de novas pesquisas sobre este produto. Há necessidade de expandir as possibilidades de dosagem para uma Concentração Mínima Inibitória, ou se há ação bactericida com a utilização deste óleo.

Referências

ALBUQUERQUE, Elaine Santiago Brilhante de; NEVES, Léa de Jesus. Anatomia foliar de Alpinia zerumbet (Pers.) Burtt & Smith (Zingiberaceae). **Acta Botanica Brasilica**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 109-121, mar. 2004. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/s0102-33062004000100010. Acesso em: 17 jan. 2024

BHATT, Gunjan; NAGARKOTI, Ranveer S.; KHOLIYA, Sushma; TIWARI, Ameeta; VERMA, Sajendra K.; VERMA, Ram S.; DAROKAR, Mahendra P.; PADALIA, Rajendra C.. Chemical and Antibacterial Activity Evaluation of Alpinia calcarata and Alpinia zerumbet Grown in Foothills Agroclimatic Conditions of Northern India. **The Open Bioactive Compounds Journal**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 15-19, 18 jun. 2021. Bentham Science Publishers Ltd.. http://dx.doi.org/10.2174/1874847302109010015.

CHAN, Eric Wei Chiang; WONG, Siu Kuin; CHAN, Hung Tuck. Alpinia zerumbet, a ginger plant with a multitude of medicinal properties: an update on its research findings. **Journal Of Chinese Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 26, n. 11, p. 775-787, 30 nov. 2017. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences. http://dx.doi.org/10.5246/jcps.2017.11.088.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 6 ed. Brasília, 2019. Parte I. p. 343-346.

GHOSH, S.; RANGAN, L.. *Alpinia*: the gold mine of future therapeutics. **3 Biotech**, [S.L.], v. 3, n. 3, p. 173-185, 18 set. 2012. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s13205-012-0089-x

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. International Journal of Food Microbiology, v. 124, n. 1, p. 91-97, 2008. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.028

INDRAYAN, A. K.; TYAGI, P. K.; AGRAWAL, N. K. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Alpinia speciosa K. Schum. rhizome from India. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, n. 2, p. 179-182, 2010. DOI:10.1080/10412905.2010.9700297.

LUZ, A. I. R.; ZOGHBI, M. G. B.; RAMOS, L. S.; MAIA, J. G. S.; SILVA, M. L.. Essential Oils of Some Amazonian Zingiberaceae, 3. Genera Alpinia and Rengalmia. **Journal Of Natural Products**, [S.L.], v. 47, n. 5, p. 907-908, set. 1984. American Chemical Society (ACS). http://dx.doi.org/10.1021/np50035a037.

SETH, S. D.; SHARMA, B. Medicinal plants in India. **Indian Journal Of Medical Research**, New Delhi, v. 120, n. 1, p. 9-1143, jul. 2004.

SILVA, Rafael Almeida da; OLIVEIRA, Beatriz Nascimento Lins de; SILVA, Luiza Pinheiro Alves da; OLIVEIRA, Maria Auxiliadora; CHAVES, Gabriela Costa. Resistência a Antimicrobianos: a formulação da resposta no âmbito da saúde global. **Saúde em Debate**, [S.L.], v. 44, n. 126, p. 607-623, set. 2020. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/0103-1104202012602. Disponível em: https://www.scielo.br/j/sdeb/a/8sybmgm7ZxDmzF8stXfY9KS/. Acesso em: 10 ago. 2024.

VAN, Hong Thien; THANG, Tran Dinh; LUU, Thao Nguyen; DOAN, Van Dat. An overview of the chemical composition and biological activities of essential oils fromAlpiniagenus (Zingiberaceae). **Rsc Advances**, [S.L.], v. 11, n. 60, p. 37767-37783, 2021. Royal Society of Chemistry (RSC). http://dx.doi.org/10.1039/d1ra07370b.

VIANA, Pâmela Ruth Santos; LEITE, Denes Sousa; MOUCHREK FILHO, Victor Elias; SOUSA, Dionney Andrade de; GUARALDI, Ana Luíza de Mattos; ALVES, Márcia Barros; FIRMO, Wellyson Araújo da Cunha; SABBADINI, Priscila Soares. Antimicrobial and anti-biofilm activities of Alpinia zerumbet (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. essential oil against Corynebacterium ulcerans**. Ciência e Natura**, [S.L.], v. 42, p. 1-18, 31 dez. 2020. Universidad Federal de Santa Maria. http://dx.doi.org/10.5902/2179460x41095. Disponível em: https://periodicos.ufsm.br/cienciaenatura/article/view/41095/47467. Acesso em: 10 ago. 2024.

VICTÓRIO, Cristiane P.; ALVIANO, Daniela S.; ALVIANO, Celuta S.; LAGE, Celso L. S.. Chemical composition of the fractions of leaf oil of Alpinia zerumbet (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. and antimicrobial activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.L.], v. 19, n. 3, p. 697-701, set. 2009. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2009000500008.

WEERAPREEYAKUL, Natthida; TAVICHAKORNTRAKOOL, Ratree; LULITANOND, Aroonlug; SANGKA, Arunnee; SUNGKEEREE, Seksit. Antibacterial activity and bioactive compounds of 50% hydroethanolic extract of Alpinia zerumbet (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. **Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine**, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 204, 2019. Medknow. http://dx.doi.org/10.4103/2221-1691.259000.

Agradecimentos

Ao Comitê de Iniciação Científica do Centro Universitário Módulo por aprovar o desenvolvimento deste projeto.