

Extrato de *Allium schoenoprasum* L. inibe o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* in vitro

Allium schoenoprasum L. extract inhibits the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in vitro

El extracto de *Allium schoenoprasum* L. inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* in vitro

Recebido: 26/12/2022 | Revisado: 10/01/2023 | Aceitado: 12/01/2023 | Publicado: 14/01/2023

Andrieli Magueroski

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7621-3705>
Universidade Alto Vale do Rio do Peixe, Brasil
E-mail: andrimagueroski2016@gmail.com

João Paulo Assolini

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4190-8835>
Universidade Alto Vale do Rio do Peixe, Brasil
E-mail: joao.assolini@uniarp.edu.br

Resumo

Objetivo: Esta pesquisa teve como objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de *Allium schoenoprasum* contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* in vitro. **Metodologia:** Foi realizado o preparo do extrato hidroalcoólico de *A. schoenoprasum* utilizando álcool 70%, em seguida, diferentes concentrações do extrato (1, 10 e 100 µg/mL) foram incubados com *S. aureus* e *E. coli* em caldo BHI durante 48 horas, e o crescimento bacteriano foi avaliado por espectrofotometria. **Resultados:** Foi observado que as concentrações de 10 e 100 µg/mL do extrato foi capaz de inibir o crescimento das bactérias *S. aureus* e *E. coli* após 48 horas quando comparado com o controle. **Conclusão:** O extrato de *A. Schoenoprasum* pode inibir o crescimento de *E. coli* e *S. aureus* in vitro, podendo ser devido à substâncias presentes nas folhas da planta, como taninos e compostos fenólicos, no entanto, futuros estudos poderão verificar a toxicidade do extrato em células do hospedeiro e até mesmo entender o mecanismo de ação da atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: Infecção; Atividade antimicrobiana; Produtos naturais; Extratos de plantas.

Abstract

Objective: This research aimed to evaluate the antimicrobial activity of hydroalcoholic extracts of *Allium schoenoprasum* against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in vitro. **Methodology:** The hydroalcoholic extract of *A. schoenoprasum* was prepared using 70% alcohol, then different extract concentrations (1, 10 and 100 µg/mL) were incubated with *S. aureus* and *E. coli* in BHI broth for 48 hours, and bacterial growth was evaluated by spectrophotometry. **Results:** It was observed that the concentrations of 10 and 100 µg/mL of the extract were able to inhibit the growth of *S. aureus* and *E. coli* bacteria after 48 hours when compared to the control. **Conclusion:** The extract of *A. Schoenoprasum* can inhibit the growth of *E. coli* and *S. aureus* in vitro, which may be due to substances present in the leaves of the plant, such as tannins and phenolic compounds, however, future studies may verify the toxicity of the extract in host cells and even understand the mechanism of action of antimicrobial activity.

Keywords: Infection; Antimicrobial activity; Natural products; Plant extracts.

Resumen

Objetivo: Esta investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana de extractos hidroalcohólicos de *Allium schoenoprasum* contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* in vitro. **Metodología:** Se preparó el extracto hidroalcohólico de *A. schoenoprasum* con alcohol al 70%, luego se incubaron diferentes concentraciones de extracto (1, 10 y 100 µg/mL) con *S. aureus* y *E. coli* en caldo BHI durante 48 horas y crecimiento bacteriano se evaluó por espectrofotometria. **Resultados:** Se observó que las concentraciones de 10 y 100 µg/mL del extracto lograron inhibir el crecimiento de las bacterias *S. aureus* y *E. coli* a las 48 horas en comparación con el control. **Conclusión:** El extracto de *A. Schoenoprasum* puede inhibir el crecimiento de *E. coli* y *S. aureus* in vitro, lo que puede deberse a sustancias presentes en las hojas de la planta, como taninos y compuestos fenólicos, sin embargo, futuros estudios podrán verificar la toxicidad del extracto en las células huésped e incluso comprender el mecanismo de acción de la actividad antimicrobiana.

Palabras clave: Infección; Actividad antimicrobiana; Productos naturales; Extractos de plantas.

1. Introdução

Bactérias patogênicas são responsáveis por causar infecções em seres humanos, devido seus fatores de virulência que participam desde a adesão até invasão de diferentes tecidos no hospedeiro (Proft & Baker, 2009).

Staphylococcus aureus são bactérias gram-positiva, em formato de coco, especificamente grupos de cocos na forma de cachos de uva, com diâmetro que varia de 0,5 a 1,5 µm. Essa espécie é aeróbica ou anaeróbica facultativa (Somerville, et al. 2009). Algumas características podem distinguir *S. aureus* de outras espécies, como a coloração amarelada ou dourada das colônias, coagulase positiva, fermentam manitol, além de serem capazes de lisar hemácias do hospedeiro (Levinson & Jawetz, 2005).

Essas bactérias são encontradas em indivíduos saudáveis, fazendo parte da microbiota da pele e mucosas de regiões diferentes do corpo, principalmente na cavidade nasal. Embora possa ser um microrganismo comensal, essa espécie é considerada um patógeno oportunista, podendo atingir diferentes tecidos e órgãos e causar desde infecções superficiais até sistêmicas, com grau de gravidade variável (Correal, et al., 2013). Essas infecções podem ser decorrentes de transmissão comunitária ou em ambientes hospitalares, sendo que *S. aureus* resistentes à metilicina (MRSA) e *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA) estão relacionadas com taxas de morbidade e mortalidade expressivas (Rossiter, et al., 2017).

Escherichia coli é uma bactéria gram-negativa com morfologia de bastonete, anaeróbios facultativos, moveis ou imóveis, pertencentes à família enterobacteriaceae. Essas bactérias fazem parte da microbiota encontradas no trato gastrointestinal de alguns animais e seres humanos (Jang, et al., 2017).

Embora algumas dessas bactérias façam parte da flora normal, elas podem ser patogênicas, sendo um dos principais microrganismos causadores de doenças veiculadas por alimentos. Esses patógenos podem classificados ou divididas em seis tipos: enteropatogênicas (EPEC), enterotoxigênicas (ETEC), enteroinvasivas (EIEC), enterohemorrágicas (EHEC), enteroagregativas (EAaggEC) e difuso-aderentes (DAEC) (Souza, et al., 2016). Além de causar distúrbios gastrointestinais, *E. coli* também podem causar infecções do trato urinário, respiratório, além de outras condições patológicas (Mittelstaedt & De Carvalho, 2006). Ademais, essas bactérias são utilizadas como parâmetro sanitário como indicativo de contaminação fecal de águas e alimentos (Jang, et al., 2017).

De forma preocupante, algumas cepas de *E. coli* apresentam uma maior virulência que acarretam em uma maior patogenicidade e resistência à alguns antibióticos, o que está relacionado com maior disseminação (Paitan, 2018).

Durante milhares de anos os produtos naturais têm sido utilizados por populações de vários lugares do mundo para tratar ou prevenir doenças, principalmente em países orientais. Esses produtos de origem natural estão ganhando espaço em outras regiões, devido ao seu fácil acesso e também pelas suas atividades biológicas já reconhecidas (Rao, et al., 2019).

Com o aumento do uso de medicamentos ou de estudos para o desenvolvimento de novas formulações provenientes de produtos naturais como terapias alternativas, é de suma importância entender os mecanismos de ação envolvidos nos efeitos biológicos, além de identificar e elucidar a resposta para verificar a eficácia, segurança e possíveis efeitos adversos, além de que as respostas podem variar de organismo para organismo (Katz & Baltz, 2016, Degorter, et al., 2012).

O gênero *Allium* compreende mais de 500 espécies de planta, que algumas dessas são utilizadas na culinária como vegetais e especiarias, além de suas propriedades etnomedicinais. Essas plantas apresentam componentes químicos como antocianinas, flavonóides, fenóis, taninos e carotenóides, que participam das respostas biológicas (Singh et al., 2018).

Allium schoenoprasum L. é popularmente conhecido como cebolinha, muito utilizada na alimentação, normalmente cultivadas ou encontradas em mercados (Štajner, et al., 2011). Essa espécie pode sentar características físicas e efeitos terapêuticos semelhantes à de outras espécies, como da cebola e do alho (Zdravković-Korać, et al., 2010).

Alguns estudos têm demonstrado que diferentes partes de *A. schoenoprasum L.* exercem efeito antioxidante *in vitro*. O óleo essencial dessa planta é capaz de inibir o crescimento de bactérias gram-positivas e negativas. Outro estudo mostrou que o

extrato das folhas de *A. schoenoprasum L.* apresenta atividade antifúngica (Parvu, et al., 2013). Além disso, outras atividades biológicas dessa planta têm sido descritas, como atividade anti-inflamatória, anti-helmíntica, anti-hipertensiva e anti-tumoral (Singh, et al., 2018).

No entanto, há poucos estudos demonstrando as atividades biológicas dessa planta e de preparações como os extratos de diferentes partes da cebolinha. Assim, com o avanço do uso de produtos naturais, suas características físico-químicas e propriedades biológicas, além da complexidade e dificuldade de controlar algumas infecções bacterianas, é grande importância a busca por novos compostos que exerçam atividade antibacteriana mais potente e com menos efeitos tóxicos para o hospedeiro. Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de *Allium schoenoprasum* contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli in vitro*.

2. Metodologia

2.1 Preparação do extrato de *Allium schoenoprasum L.*

O extrato foi preparado de acordo com Morais et al. (2020), com algumas modificações. Brevemente, para a preparação dos extratos hidroalcoólicos, as folhas de *Allium schoenoprasum L.* foram secas, após foram moídas e a extração foi realizada através do método de maceração com etanol a 70%, passando pelo rotaevaporador, resultando no extrato bruto de *Allium schoenoprasum L.* (EHAS).

2.2 Microrganismos

Foram utilizadas cepas de bactérias gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 25922) provenientes da Universidade Alto Vale do Rio do Peixe (UNIARP).

2.3 Atividade antibacteriana dos extratos de *Allium schoenoprasum L.*

Para avaliar a atividade antibacteriana dos extratos foi realizado o teste de microdiluição em caldo BHI de acordo com Oliveira (2019) com algumas modificações. Primeiramente foi avaliada atividade inibitória ou bacteriostática. Para isso, diferentes concentrações dos extratos de *Allium schoenoprasum L.* (1, 10 e 100 µg/mL) foram adicionadas em tubos de ensaio estéreis. Após, foram adicionadas suspensões bacterianas de *E. coli* ou *S. aureus* em caldo BHI (turbidez 0,5 na escala de MacFarland) e incubadas por 48 h à 37°C. Após esse período foi avaliada a turbidez dos tubos pela densidade óptica (D.O.) a 600 nm por espectrofotometria. Como controle positivo foi utilizado meio BHI com inóculo de *E. coli* ou *S. aureus*, e como controle negativo foi utilizado apenas meio BHI sem bactérias.

2.4 Análise estatística

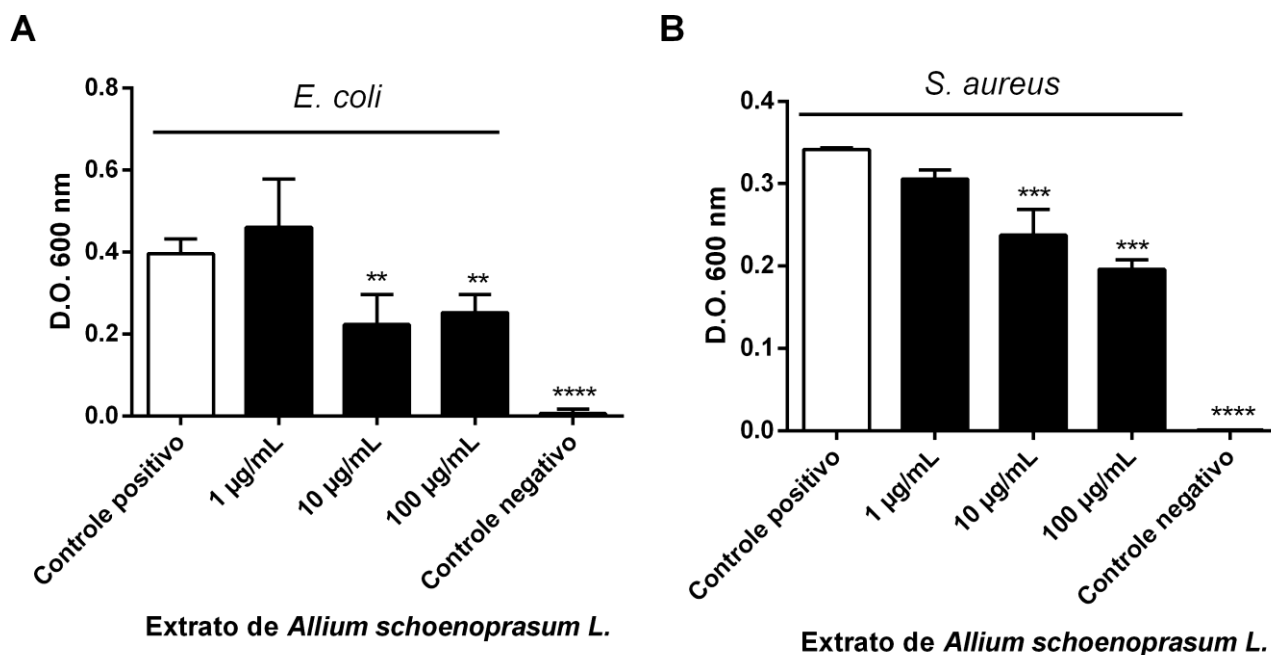
Foram utilizadas análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas, utilizando o programa estatístico Graphpad Prim 6.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego California, USA) e foram consideradas diferenças significativas quando p-valor ≤ 0.05 . Foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

3. Resultados e Discussão

Um dos problemas enfrentados nas últimas décadas é a resistência de bactérias à antibióticos. Essa resistência aumentada pode ser devido à prescrição de antibióticos contra doenças causadas por outros tipos de microrganismos, além do uso indiscriminado (Rossiter, et al., 2017). Assim, os produtos naturais vêm ganhando espaço a cada dia devido suas atividades biológicas e as características estruturais de suas moléculas, com pesquisas que visam o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de diversas doenças (Rodrigues, et al., 2016).

Assim, foi avaliado a atividade antimicrobiana direta do extrato hidroalcoólico de *Allium schoenoprasum* L. sobre *E. coli* e *S. aureus* (Figura 1).

Figura 1 - Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *Allium schoenoprasum* L. sobre *E. coli* (A) e *S. aureus* (B). Diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de *Allium schoenoprasum* L. foram incubados com *E. coli* (A) e *S. aureus* (B) por 48 horas e o crescimento bacteriano avaliado pela densidade óptica (D.O.) à 600 nm. Como controle positivo foi utilizado meio BHI com bactérias (A – *E. coli*; B – *S. aureus*), e como controle negativo foi utilizado apenas meio BHI sem o inóculo bacteriano. ** p < 0.01; *** p < 0.001; **** p < 0.0001 diferença significativa em comparação ao controle positivo.



Fonte: Autores.

Na Figura 1 é possível ser observado que as concentrações de 10 e 100 µg/mL do extrato de *Allium schoenoprasum* L. foi capaz de inibir o crescimento das duas bactérias quando comparado com o controle positivo (bactérias sem tratamento). No entanto, a concentração de 1 µg/mL não exerceu efeito inibitório sobre o crescimento bacteriano.

Tem sido descrito que o óleo essencial de *Allium schoenoprasum* L. inibe o crescimento de bactérias gram-positivas e negativas possivelmente pela maior presença de compostos de enxofre. Parvu et al. (2013) mostraram que o extrato das folhas de *A. schoenoprasum* L. apresenta atividade antifúngica contra *Aspergillus niger*, *Penicillium gladioli*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis paeoniae* e *B. cinérea*.

Diferentes espécies de plantas do gênero *Allium* também são utilizadas na etnomedicina na prevenção de algumas doenças. Tem sido descrito que estas plantas apresentam diversas atividades biológicas, como antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antitumoral, anti-viral, anticoagulante, neuroprotetora, imunomoduladora. Essas atividades podem ser variáveis de acordo com as concentrações de algumas substâncias na planta tais como antocianinas, flavonóides, fenóis, taninos e carotenóides (Singh, et al., 2018). O extrato de *A. Schoenoprasum* contém taninos e compostos fenólicos. Os taninos apresentam vários efeitos biológicos como ação adstringente, atividade antidiarreica, antisséptica, antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antiviral e antiparasitária (Castejon, 2011, Bruneton, 1991)

Corroborando com nosso estudo, Singh e colaboradores (2018) demonstraram que *A. Schoenoprasum* apresenta

concentrações distintas de compostos fenólicos em diferentes partes da planta, sendo que os principais compostos fenólicos encontrados foram ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico e ácido gálico. Além disso, tem sido descrito que os fenóis desempenham uma importante atividade antioxidante (Van Hung, 2016).

Embora vários produtos naturais apresentem diversas propriedades biológicas, os alvos moleculares e farmacológicos, parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos ainda precisam ser melhores estudados. Todavia, o grande número de moléculas e componentes presentes nas plantas, podem atuar de forma combinada para exercerem ou até mesmo potencializar os efeitos desejáveis (Rao, et al., 2019).

4. Considerações Finais

O presente estudo mostrou que o extrato hidroalcoólico de *A. Schoenoprasum*, popularmente conhecida como cebolinha, é capaz de inibir a crescimento de bactérias gram negativas *E. coli* e gram positivas *S. aureus in vitro*. Essa atividade antimicrobiana pode ser devido a presença de diferentes substâncias nas folhas dessa planta. Futuros estudos serão realizados para avaliar a toxicidade do extrato em células hospedeiras, a atividade microbicida e seus mecanismos de ação, bem como estudos *in vivo* para avaliar a modulação da resposta em um modelo animal. Além disso, mais estudos serão realizados para avaliar a atividade do extrato, bem como suas frações ou compostos isolados com diferentes isolados clínicos de *E. coli* e *S. aureus*, bem como de outras espécies bacterianas, podendo comparar com antibióticos padrões utilizados na clínica.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Fundo de Apoio à Pesquisa (FAP) da Universidade Alto Vale do Rio do Peixe (UNIARP) e a UNIARP pelo apoio para o desenvolvimento da pesquisa.

Referências

- Bruneton, J., Barton, D. H. R., del Fresno, Á. V., Accame, E. C., & Lizabe, M. R. (1991). *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia* (pp. 305-306). Zaragoza: Acribia.
- Castejon, F. V. (2011). Taninos e saponinas. *Seminário apresentado junto à disciplina Seminários Aplicados do Programa de Pós-Graduação–Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 30*, 1292-1298.
- Correal, J. C., de Andrade Marques, E., Guilherme, W. L., de Souza Leao, R., & Damasco, P. V. (2013). Staphylococcus aureus infections: change in epidemiology at Pedro Ernesto University Hospital/Infecções por Staphylococcus aureus: mudança do perfil epidemiológico no Hospital Universitario Pedro Ernesto. *Revista HUPE, 12*(3), 31-47.
- DeGorter, M. K., Xia, C. Q., Yang, J. J., & Kim, R. B. (2012). Drug transporters in drug efficacy and toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology, 52*, 249-273.
- Jang, J., Hur, H. G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., & Ishii, S. (2017). Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications—a review. *Journal of applied microbiology, 123*(3), 570-581.
- Katz, L., & Baltz, R. H. (2016). Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 43*(2-3), 155-176.
- Levinson, W., & Jawetz, E. (2005). *Microbiologia médica e imunologia*, trad. José Procópio M. Senna-7ª ed. Porto Alegre. Artmed.
- Mittelstaedt, S., & de Carvalho, V. M. (2006). Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) O157: H7—revisão* Enterohemorrágica Escherichia coli (EHEC) O157: H7—review. *Rev Inst Ciênc Saúde, 24*(3), 175-82.
- Morais, H. L. M. D. N., Feitosa, T. C., Rodrigues, J. G. M., Lira, M. G. S., Nogueira, R. A., Luz, T. R. S. A., & Miranda, G. S. (2020). Hydroalcoholic extract of Caryocar brasiliense Cambess. leaves affect the development of Aedes aegypti mosquitoes. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 53*.
- Oliveira, K. K. C. D. (2019). Atividade antibacteriana de recursos naturais contra Staphylococcus aureus. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas.
- Paitan, Y. (2018). Current trends in antimicrobial resistance of Escherichia coli. *Escherichia coli, a versatile pathogen*, 181-211.
- Pârvu, M., Rusu, I., & Roșca-Casian, O. (2013). The antifungal activity of Allium schoenoprasum L. leaves. *Contributii Botanice, 48*.

- Proft, T., & Baker, E. N. (2009). Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria - structure, assembly and their role in disease. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 66(4), 613–635.
- Rao, T., Tan, Z., Peng, J., Guo, Y., Chen, Y., Zhou, H., & Ouyang, D. (2019). The pharmacogenetics of natural products: A pharmacokinetic and pharmacodynamic perspective. *Pharmacological Research*, 146, 104283.
- Rodrigues, T., Reker, D., Schneider, P., & Schneider, G. (2016). Counting on natural products for drug design. *Nature chemistry*, 8(6), 531-541.
- Rossiter, S. E., Fletcher, M. H., & Wuest, W. M. (2017). Natural products as platforms to overcome antibiotic resistance. *Chemical reviews*, 117(19), 12415-12474.
- Singh, V., Chauhan, G., Krishan, P., & Shri, R. (2018). *Allium schoenoprasum* L.: a review of phytochemistry, pharmacology and future directions. *Natural product research*, 32(18), 2202-2216.
- Somerville, G. A., & Proctor, R. A. (2009). The biology of staphylococci. *Staphylococci in human disease*, 1-18.
- Souza, C. D. O., Melo, T. R. B., Melo, C. D. S. B., Menezes, Ê. M., Carvalho, A. C. D., & Monteiro, L. C. R. (2016). *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreioagênica versátil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 7(2), 79-91.
- Štajner, D., Popović, B. M., Čalić-Dragosavac, D., Malenčić, Đ., & Zdravković-Korać, S. (2011). Comparative study on *Allium schoenoprasum* cultivated plant and *Allium schoenoprasum* tissue culture organs antioxidant status. *Phytotherapy Research*, 25(11), 1618-1622.
- Van Hung, P. (2016). Phenolic compounds of cereals and their antioxidant capacity. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(1), 25-35.
- Zdravković-Korać, S., Milojević, J., Tubić, L., Čalić-Dragosavac, D., Mitić, N., & Vinterhalter, B. (2010). Somatic embryogenesis and plant regeneration from root sections of *Allium schoenoprasum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 101(2), 237-244.