

**Fenólicos totais, toxicidade e atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de
Alpinia zerumbet (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm**

**Total phenolics, toxicity and antimicrobial activity of the essential oil of the leaves of
Alpinia zerumbet (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm**

**Fenólicos totales, toxicidad y actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de
Alpinia zerumbet (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm**

Recebido: 03/06/2020 | Revisado: 04/06/2020 | Aceito: 05/06/2020 | Publicado: 16/06/2020

Matheus dos Santos Ribeiro

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1572-2164>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

E-mail: matheus_santosribeiro@outlook.com

Gustavo Oliveira Everton

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0457-914X>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

E-mail: gustavooliveiraevertton@gmail.com

Paulo Victor Serra Rosa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1782-5896>

Faculdade Maurício de Nassau, Brasil

E-mail: paullovictorserra@gmail.com

Erick Rickman Nascimento Pimenta

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5854-5343>

Universidade CEUMA, Brasil

E-mail: erickrickmanbacuri@hotmail.com

Ari Pereira de Araújo Neto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6903-4127>

Faculdade Maurício de Nassau, Brasil

E-mail: aripereiraneto@gmail.com

Andressa Almeida Santana Dias

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1671-8338>

Faculdade Maurício de Nassau, Brasil

E-mail: andressasantana@gmail.com

Ana Patrícia Matos Pereira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4478-4209>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

E-mail: ap.matos11@hotmail.com

Dorileia Pereira do Nascimento

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9929-2661>

Faculdade Maurício de Nassau, Brasil

E-mail: darascimento@gmail.com

Ana Maria Almeida Silva Carvalho

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2075-5780>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

E-mail: aninha_biomed@yahoo.com.br

Leila da Silva Silveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1050-4483>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

E-mail: alielarcanjo@hotmail.com

Irlane Thais Pereira de Sousa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4622-1066>

Faculdade Maurício de Nassau, Brasil

E-mail: irllane.thais@gmail.com

Victor Elias Mouchrek Filho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2855-7292>

Universidade Federal do Maranhão, Brasil

E-mail: victor.mouchrek@ufma.br

Resumo

Este estudo teve por objetivo a determinação dos fenólicos totais, avaliação da toxicidade e a atividade antimicrobiana do óleo essencial (OE) das folhas de *Alpinia zerumbet*. O OE foi extraído por hidrodestilação e os parâmetros físico-químicos foram determinados de acordo com a Farmacopeia Brasileira. O ensaio da toxicidade seguiu o bioensaio de letalidade frente ao organismo não-alvo *Artemia salina* Leach. A atividade antimicrobiana seguiu a metodologia descrita pelo Clinical and Laboratory Standards Institute utilizando o Método de Difusão de Disco e Diluição em Caldo para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para ação do OE frente à *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. O rendimento do OE foi de 0,71%. A Concentração Letal 50% (CL₅₀) para a

ação do OE frente a *Artemia salina* L. foi de 280,40 mg/L, sendo considerado atóxico. Através dos ensaios antimicrobianos, o OE apresentou atividade bactericida frente às bactérias *E. coli* e *S. aureus*, e atividade fungicida frente aos fungos *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.* Conclui-se que o OE apresenta um bom potencial antimicrobiano, sendo sua aplicação apreciada pela sua classificação como OE atóxico.

Palavras-chave: *Alpinia*; Antibacteriano; Toxicidade.

Abstract

This study aimed to determine total phenolics, assess toxicity and antimicrobial activity of essential oil (EO) of *Alpinia zerumbet* leaves. The EO was extracted by hydrodistillation and the physicochemical parameters were determined according to the Brazilian Pharmacopoeia. The toxicity assay followed the lethality bioassay against the non-target organism *Artemia salina* Leach. The antimicrobial activity followed the methodology described by the Clinical and Laboratory Standards Institute using the Method of Disc Diffusion and Broth Dilution to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for the action of EE against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus sp.* and *Penicillium sp.* OE yield was 0.71%. Lethal Concentration 50% (LC₅₀) for the action of EO against *Artemia salina* L. 280.40 mg/L, being considered nontoxic. Through the antimicrobial assays, the EO presented bactericidal activity against the bacteria *E. coli* and *S. aureus*, and fungicide activity against the fungi *Aspergillus sp.* and *Penicillium sp.* It was concluded that the EO has a good antimicrobial potential, and its application is appreciated by its classification as nontoxic EO.

Keywords: *Alpinia*; Antibacterial; Toxicity.

Resumen

Este estudio tenía como objetivo determinar el total de fenólicos, evaluar la toxicidad y la actividad antimicrobiana del aceite esencial (AE) de las hojas de *Alpinia zerumbet*. La AE fue extraída por hidrodestestación y los parámetros físicoquímicos se determinaron de acuerdo con la Farmacopea Brasileña. El ensayo de toxicidad siguió al bioensayo de letalidad contra el organismo no objetivo *Artemia salina* Leach. La actividad antimicrobiana siguió la metodología descrita por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio utilizando el Método de Difusión de Discos y Dilución de Caldo para determinar la Concentración Inhibidora Mínima (CIM) para la acción de AE contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.* AE yield fue 0.71%. Concentración Letal 50% (CL₅₀) para la acción de AE contra *Artemia salina* L. 280,40 mg/L, siendo considerados no tóxicos. A través de los ensayos antimicrobianos, la AE presentó actividad bactericida contra las bacterias *E. coli* y *S. aureus*, y la actividad fungicida contra los hongos *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.* Se concluye que la EO tiene un buen potencial antimicrobiano, y su aplicación es apreciada por su clasificación como OE no tóxica.

Palabras clave: *Alpinia*; Antibacteriano; Toxicidad.

1. Introdução

O uso de plantas para fins medicinais não é algo recente, pelo contrário, vem desde os primórdios da humanidade e vem sendo transmitida pelas gerações com o passar do tempo. Elas são definidas como aquelas capazes de produzir princípios ativos que possam alterar o funcionamento de órgãos e sistemas, reestabelecendo o equilíbrio orgânico nos casos de enfermidades (Furtado et al., 2015).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 80% da população de países em desenvolvimento utilizam a medicina tradicional como prática na atenção primária à saúde e, deste total, 85% fazem uso de plantas medicinais e extratos vegetais (Bruning et al., 2012).

Algumas das propriedades das plantas medicinais estão relacionadas aos seus óleos essenciais (OE's), que são componentes que integram os metabólitos secundários das plantas, isto é, fazem parte do sistema não primal destes organismos, possuindo funções de proteção contra elementos externos às plantas (Simões et al., 2010).

Estes compostos são principalmente extraídos de flores, botões, folhas, ramos, cascas, sementes, frutos, raízes e rizomas apresentando compostos aromáticos voláteis dentre os quais estão os terpenos e seus derivados (carvacrol, timol, eugenol, terpineno, linalol e carvona), que são os principais responsáveis por sua atividade antimicrobiana (Sarto & Junior, 2014; Aquino et al., 2010). Estes compostos são capazes de interagir em diferentes moléculas alvo e nas funções das células bacterianas como mecanismos antibacterianos principalmente de inibição da síntese de ácido nucléico, distúrbios nas propriedades da membrana citoplasmática e no metabolismo energético (Barbosa et al., 2015).

Dentre as inúmeras plantas medicinais produtoras de OE's tem-se a *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm, uma espécie originária da Ásia, pertencente à família Zingiberaceae, e encontrada na literatura científica com as sinonímias de *Alpinia speciosa* K. Shum, *Costus zerumbet* Pers., *Languas speciosa* Small e *Zerumbet speciosum* J. C. Wendel (Lorenzi & Souza, 2001). É uma planta herbácea, robusta e perene com colunas de 2 a 3 metros de altura, lisa e verde com folhas oblongas e pontudas. Além de alternadas são completas e simples, com base aguda e margem inteira. Suas flores são alvas com lacínios róscos no ápice, dispostas em cachos grandes levemente aromatizadas, sendo o fruto em formato de cápsula (Kriek et al., 2008). Essa planta é conhecida popularmente como colônia, sendo muito encontrada no Nordeste do Brasil, e utilizada como anti-hipertensiva, diurética e

febrífuga (Correa et al., 2010).

A *A. zerumbet* tem como classes de constituintes químicos, alcaloides, flavonóides e como principais componentes do OE são os monoterpenos com maior concentração de 1,8-cineol e terpeno-4-ol, havendo trabalhos que comprovam sua atividade antimicrobiana (Victório et al., 2009).

Quando utilizados os princípios ativos do OE de *A. zerumbet* foram observados: atividade relaxante de duodeno, onde o terpeno-4-ol, quando administrado na dose de 60 mM inibe a sua contração fásica, provavelmente pelo antagonismo de cálcio dependente [11] e ação anti-inflamatória e redutora da substância P (Liao et al., 2012; Juergens et al., 1998). Além disso, foi constatado o 1,8-cineol com efeito anti-inflamatório de vias aéreas (Santos & Rao, 2000).

Apesar de algumas de suas propriedades medicinais serem comprovadas, a escolha desta espécie foi motivada por seus estudos relacionados a bioprospecção em atividades biológicas ainda serem pouco conhecidas. Mediante isto, este estudo teve por objetivo avaliar a toxicidade e o potencial antimicrobiano do OE das folhas de *A. zerumbet*.

2. Metodologia

2.1. Material vegetal

A coleta do material vegetal utilizado nesta pesquisa foi realizada em novembro de 2019. As folhas de *A. zerumbet* foram coletadas no povoado Mata do Ipiranga, na região de Itapecuru-Mirim – MA. Os materiais vegetais foram identificados pelo Herbário Ático Seabra da Universidade Federal do Maranhão. Após a coleta, o material vegetal foi transportado para o Laboratório de Pesquisa e Aplicação de Óleos Essenciais (LOEPAV/UFMA), onde foi submetido à secagem em estufa de secagem de ar convectiva FANEM 520 a 45°C por 24 horas, e posteriormente, trituradas em moinho de facas.

2.2. Obtenção dos óleos essenciais

Para extração dos OE's, utilizou-se a técnica de hidrodestilação com um extrator de Clevenger de vidro acoplado a um balão de fundo redondo acondicionado em manta elétrica, como fonte geradora de calor. Foram utilizadas 200g das folhas secas de *A. zerumbet* (jardineira), adicionando-se água destilada (1:10). A hidrodestilação foi conduzida a 100°C por 3h recolhendo-se o OE extraído. Cada OE foi seco por percolação com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e centrifugado. Essas operações foram realizadas em triplicatas e as amostras armazenadas em ampolas de vidro âmbar sobe refrigeração de 4°C. Posteriormente submetido

às análises. Foram determinados os parâmetros físico-químicos dos OE's: densidade, solubilidade, cor e aparência de acordo com a Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019). O rendimento do OE foi expresso em porcentagem na relação massa/volume pela medida de densidade.

2.3. Toxicidade

Este ensaio foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Meyer et al. (1982). Para a avaliação da letalidade de *Artemia salina* Leach, foi preparada uma solução salina estoque de cada OE na concentração de 10.000 mg L⁻¹ e 0,02 mg de Tween 80 (tenso ativo).

Alíquotas de 5, 50 e 500 µL desta foram transferidas para tubos de ensaio e completados com solução salina já preparadas anteriormente até 5 mL, obtendo-se no final concentrações de 10, 100 e 1000 mg L⁻¹, respectivamente. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas, onde dez larvas na fase náuplio foram transferidas para cada um dos tubos de ensaio.

Para o controle do branco utilizou-se 5 mL da solução salina, para o controle positivo K₂Cr₂O₇ e para o controle negativo 5 mL de uma solução 4 mg L⁻¹ de Tween 80. Após 24 horas de exposição, realizou-se a contagem das larvas vivas, considerando-se mortas aquelas que não se movimentaram durante a observação e nem com a leve agitação do frasco.

Adotou-se o critério estabelecido por Dolabella (1997) para classificação da toxicidade dos OE's, sendo considerado altamente tóxico quando CL₅₀ ≤ 80 mg L⁻¹, moderadamente tóxico para 80 mg L⁻¹ ≤ CL₅₀ ≤ 250 mg L⁻¹ e levemente tóxico ou atóxico quando CL₅₀ ≥ 250 mg L⁻¹.

A análise estatística dos dados para a CL₅₀ foi realizada de acordo com o método de Reed & Muench (1938), a partir da tabela contendo os dados de mortalidade para cada concentração testada, é construído um gráfico onde se observa uma curva para o acúmulo de animais mortos em cada log da concentração e outra curva para o acúmulo de sobreviventes. O ponto de intercessão entre as curvas é a Concentração Letal 50% (CL₅₀), pois nesse ponto o número de animais sobreviventes é igual ao número de animais mortos. O intervalo de confiança foi calculado segundo o método de Pizzi (1950) no qual se constrói um gráfico do percentual de mortos versus logaritmo (log) da concentração.

2.4. Fenólicos totais

A determinação dos compostos fenólicos totais do OE foi realizada com adaptação do

método de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2018).

Utilizou-se 5 mg do óleo essencial diluído em 1 mL de etanol. A esta solução foi adicionado 3 mL de água destilada, 500 µL do reagente Folin-Ciocalteu e 2,0 mL de carbonato de sódio a 20%. A solução formada foi levada ao banho-maria a 50 °C por 5 min, retirada e deixada para esfriar; e, então, foi realizada a leitura em espectrofotômetro manual, em comprimento de 760 nm. A curva padrão foi expressa em mg L⁻¹ de ácido tânico.

2.5. Padronização do inóculo microbiano para ensaios de sensibilidade

Foram utilizadas duas cepas de bactérias: *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e duas cepas de fungos: *Aspergillus* sp. (ATCC 201291) e *Penicilium* sp. (ATCC 11597) doadas pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA). Estas foram previamente identificadas e confirmadas pelas provas bioquímicas.

Culturas microbianas puras mantidas em ágar TSA foram repicadas para caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) e incubadas a 35 °C até atingirem fase exponencial de crescimento (4-6 h). Após esse período, as culturas tiveram sua densidade celular ajustada em solução salina 0,85% estéril, de modo a se obter uma turbidez comparável à da solução padrão de McFarland 0,5, o que resulta em uma suspensão microbiana contendo aproximadamente 1,5 x 10⁸ UFC mL⁻¹ de acordo com as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020).

2.6. Método de Difusão de Disco (MDD)

A técnica de difusão de disco foi realizada segundo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020) que padroniza os testes de sensibilidade de antimicrobianos por disco-difusão. Primeiro foram preparadas as placas com o meio de cultura Ágar Mueller Hinton (AMH) para as bactérias e Ágar Mueller Hinton (AMH) contendo 2% de azul de metileno e Ágar Sabourad Dextrose (ASD) para os fungos e após sua solidificação foi distribuído à suspensão microbiana e fúngica na superfície do ágar e deixado em repouso à temperatura ambiente por 30 min. Logo após são preparados os discos contendo 50 µL dos OE's e os discos com concentrações definidas dos antibióticos. Utilizando-se pinça esterilizada, os discos foram distribuídos sobre a superfície do ágar.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 24 horas. Os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados, incluindo o diâmetro do disco. Esses ensaios foram feitos em triplicata. Os valores dos halos de inibição foram as médias das

medidas dos três resultados. Ensaios realizados em triplicata.

2.7. Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida (CBM) e Fungicida Mínima (CFM)

O ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizado empregando-se a técnica de diluição em caldo, proposta pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2020). Primeiramente foram preparadas soluções do OE utilizando-se dimetilsufóxido (DMSO) a 2%, sendo preparadas diluições seriadas em caldo MH para o ensaio bacteriano e em caldo RPMI para o ensaio fúngico, resultando nas concentrações de 10 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A cada concentração foram adicionadas suspensões microbianas e fúngicas contendo $1,5 \times 10^8$ UFC mL^{-1} das cepas. Os tubos foram incubados a 35° por 24h para as cepas bacterianas e 27°C por 24-48h para as cepas fúngicas. Foram realizados os controles de esterilidade e crescimento para o ensaio realizado. Após o período de incubação, foi verificada CIM do OE, sendo definida como a menor concentração que visivelmente inibiu o crescimento bacteriano e fúngico (ausência de turvação visível). Ensaios realizados em triplicata.

Para o ensaio de Concentração Bactericida Mínima (CBM) empregou-se uma alíquota de 100 μL das diluições provenientes do caldo MH e para Concentração Fungicida Mínima (CFM) das diluições provenientes do caldo RPMI que visivelmente inibiram o crescimento microbiano. As alíquotas foram inoculadas em AMH e AMH (2% azul de metileno) com posterior incubação a 35°C por 24h. A CBM e CFM foram determinadas como a menor concentração que visualmente no ensaio de CIM apresentou inibição de crescimento e que nas culturas para os ensaios bactericida e fungicida também não apresentaram crescimento microbiano.

3. Resultados e Discussão

3.1. Parâmetros físico-químicos

Os parâmetros físico-químicos são de grande suma importância não somente para determinar a qualidade de determinado produto, como também para verificar sua pureza e estes estão apontados na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos dos OE's

Propriedades físico-químicas	OE <i>A. zerumbet</i>
-------------------------------------	------------------------------

Densidade (g mL⁻¹)	0,8820
Índice de refração (nD 25°)	1,475
Cor	Amarelo
Aparência	Límpida
Rendimento (%)	0,71

Fonte: Autores

Os estudos com o objetivo de avaliar os parâmetros físico-químicos do OE de *A. zerumbet* foram satisfatórios quando comparados aos resultados encontrados na literatura e estão de acordo com os critérios estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019).

Com os resultados obtidos comparou-se o rendimento do OE de *A. zerumbet* aos resultados obtidos por Rezende et al., (2011) que obtiveram um rendimento de 0,74%. Santos Júnior et al., (2019), que extraiu os OE's obtidos da secagem por convecção de ar forçada das folhas aplicando três temperaturas diferentes e obtiveram um rendimento de 0,24% para o OE obtido da secagem a 30°C, 0,71% para o OE das folhas secas a 45°C, semelhante ao obtido neste estudo e 0,64% para OE advindo da secagem conduzida a 55°C. Resultados inferiores foram observados por Barcelos et al., (2010) ao relatarem um rendimento de 0,25% para o OE obtido a partir da secagem na temperatura de 30°C, porém semelhante ao rendimento descrito por Santos Júnior et al., (2019) do seu OE obtido das folhas secas a 30 °C.

Elzaawely et al., (2007) obtiveram um rendimento de 0,07% de OE de *A. zerumbet* extraído de 100 g plantas pulverizadas com sulfato de cobre. Resultados semelhantes foram encontrados por Satou et al., (2010), porém as folhas foram destiladas por 1,5 h, imediatamente após serem coletadas. Comparando os resultados para o OE de *A. zerumbet* estudado com os da literatura, pode-se observar que houve uma semelhança entre eles, no que diz respeito aos parâmetros analisados. As diferenças nos valores encontrados podem ser atribuídas a fatores tais como época de coleta, diferentes tipos de solo, condições e tempo de armazenamento (Vitti & Brito, 2003).

Natta et al., (2008) destacam que tais diferenças podem estar relacionadas com a idade da planta e do ambiente, e as características genéticas. De acordo com Gobbo-Neto e Lopes (2007), um dos fatores de maior importância é a coleta do material vegetal, visto que a quantidade dos constituintes e a sua natureza podem variar de acordo com a época do ano.

3.2. Fenólicos totais

O resultado do teor total de fenólicos do OE de *A. zerumbet* está apresentado na Tabela 2. O conteúdo fenólico total (CPT) foi expresso como equivalentes de ácido tânico (mg EAT / g de material vegetal) a equação da reta obtida foi $y = 0,05857x + 0,06000$ ($R^2 = 0,9998$), onde y representa a absorvância e x a concentração equivalente de ácido tânico.

Tabela 2: Fenólicos totais (CFT), mg EAT g⁻¹, nos OE *A. zerumbet*

Equação da reta	R ²	CFT
$y = 0,05857x + 0,06000$	0,9998	413,18 mg EAT g ⁻¹

Fonte: Autores

O OE de *A. zerumbet* utilizado no presente estudo, apresentado na Tabela 2, pôde confirmar um quantitativo importante de compostos fenólicos, o que se torna de grande relevância já que os fenólicos são frequentemente associados a vários efeitos positivos à saúde, incluindo efeitos antioxidantes, diminuição do risco de doenças cardiovasculares, mecanismos anticâncer e propriedades anti-inflamatórias (Singh et al., 2012). O conteúdo fenólico total para o OE para a espécie em estudo encontra-se pouco divulgado na literatura e enfatiza a importância de divulgação deste estudo.

Um quantitativo semelhante em base de equivalência grama de ácido gálico para os extratos da espécie *A. zerumbet* foram encontrados na literatura. Souza (2018) relatam que para o teor total de fenólicos para o extrato das folhas da espécie *A. zerumbet* esteve em 9,80±0,28g EAG/100g e para as flores em 7,93±0,16g GAE/100g. Os resultados também corroboram com os apresentados por Elzaawely et al., (2007), que observaram para o extrato aquoso das flores e sementes de *A. zerumbet* resultados variando entre 5,67 e 1,37g de EAG/g, respectivamente. Chompoo et al., (2012) destaca que o extrato aquoso da *A. zerumbet* apresenta o maior teor de CFT, com maiores valores para as sementes (18,8 g EAG/g de extrato), seguidas dos rizomas (12,45 g GAE/g), flores (7,51g GAE/g), caules (5,94 g GAE/g), pericarpos (5,84 g GAE/g) e folhas (4,78 g GAE/g).

Elzaawely et al., (2007) demonstraram que plantas tratadas com sulfato de cobre apresentaram maior nível de fenólicos totais. Considerando que substâncias naturais podem ser responsáveis pelo efeito de proteção contra os riscos de muitos processos patológicos, os resultados descritos neste estudo estimulam a continuidade dos estudos para avaliar a ação antioxidante de substâncias isoladas no OE de *A. zerumbet*.

3.3. *Atividade antimicrobiana*

Os resultados referentes aos ensaios para determinação da atividade antimicrobiana e antifúngica estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Sensibilidade das cepas microbianas para ação do OE frente aos microrganismos

Espécie	DHI	CIM	CBM	CFM
<i>E. coli</i>	12	400	700	-
<i>S. aureus</i>	25	200	550	-
<i>Aspergillus sp.</i>	31	150	-	520
<i>Penicillium sp.</i>	9	450	-	800

Nota: DHI- diâmetros médios dos halos de inibição (mm); CIM- concentração inibitória mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$); CBM- concentração bactericida mínima $\mu\text{g mL}^{-1}$; **Fonte:** Autores

Conforme os critérios estabelecidos por Moreira et al., (2005), a classificação para sensibilidade de microrganismos frente a ação de produtos naturais, é definida de acordo com o diâmetro do halo de inibição formado, sendo classificados como resistentes quando o halo de inibição for menor que 8 mm e sensíveis para halos de 9 a 14 mm. Dessa forma, os halos de inibição formados permitem classificar todas as cepas bacterianas como sensíveis frente ao OE de *A. zerumbet*.

O OE de *A. zerumbet* foi mais eficiente ao inibir o crescimento bacteriano de *S. aureus* (25 mm) e de *Aspergillus sp.* (31 mm), quando comparado a *E. coli* que apresentou halo de 11 mm e ao *Penicillium sp.*, que apresentou um halo de 9 mm. Santos Junior et al., (2019) constatou em seu estudo que o OE obtido através da secagem da *A. zerumbet* a 45 °C o melhor desempenho ao inibir a bactéria *S. aureus*, revelando um halo de inibição de 25 mm, valor semelhante ao deste estudo. Já OE obtido empregando a secagem na temperatura de 30 °C ao ser avaliado pela ação antimicrobiana apresentou um halo de inibição de 15 mm e o OE obtido na temperatura de 55 °C não apresentou todo o potencial biológico bactericida. O mesmo foi observado para a bactéria *E. coli*, onde a temperatura de 45 °C apresentou o melhor desempenho bactericida, com um halo de 11 mm, semelhante ao deste estudo. O mesmo não ocorreu com o OE obtido na temperatura de 55 °C, que não apresentou potencial bactericida.

Kerdudo et al., (2017) relataram em seus estudos que o OE das flores de *A. zerumbet* apresentou uma porcentagem de inibição superior a 90% contra *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Aspergillus niger*, *S. aureus* e *Candida albicans*. Victório et al., (2009) observaram que o OE das folhas da *A. zerumbet* apresentou um halo de inibição de 14 mm contra a *Candida*

albicans e 30 mm contra *Cryptococcus neoformans*. Atividade antifúngica do OE das flores de *A. zerumbet* foi relatada por Morita (1992) contra as cepas de *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium proliferatum*, e *Alternaria alternate*. Halos de inibição contra as cepas fúngicas testadas neste estudo não foram encontradas na literatura.

Castro et al., (2016) encontraram em seus estudos um halo de inibição superior de 35 mm contra a cepa de *S. aureus* isolada dos tetos mamários de vacas mestiças, havendo inibição total do crescimento bacteriano induzida pela concentração de 100 mg mL⁻¹. Apesar de ter resultados satisfatórios em seu estudo, Victório et al., (2009) constataram resultados inferiores para a *S. aureus*, com um halo de inibição de 12 mm e para a *E. coli* 12 mm.

De acordo com Aligiannis et al., (2001), a classificação da atividade antimicrobiana para espécimes vegetais, segundo os resultados da CIM, é considerada de forte inibição: CIM até 500 µg mL⁻¹; inibição moderada: CIM entre 600 e 1000 µg mL⁻¹; e fraca inibição: CIM acima de 1000 µg mL⁻¹.

O valor da CIM do OE de *A. zerumbet* frente às cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *Aspergillus sp* e *Penicillium sp* foram de 400 µg mL⁻¹, 200 µg mL⁻¹, 150 µg mL⁻¹ e 450 µg mL⁻¹, respectivamente, conforme a Tabela 4. Pelos resultados obtidos, afirma-se que o OE deste estudo apresentou potencial de forte inibição frente a todas as bactérias e fungos testados neste estudo (Castro et al., 2016).

Entretanto, na análise feita por Xuan et al., (2019), os autores relataram fraca inibição do extrato de fração hexânica das flores de *A. zerumbet* contra o *S. aureus*, que exibiu CIM de 512 µg mL⁻¹. Mendes et al., (2015) em seus estudos avaliaram a atividade antibacteriana do OE de *A. zerumbet* e obtiveram uma fraca atividade para o *S. aureus* com CIM de ≥ 1024 µg mL⁻¹, e para a *E. coli* uma forte atividade com CIM de 256 µg mL⁻¹.

O ensaio para Concentração Bactericida Mínima apontou melhores resultados para o OE frente a *S. aureus*, observando-se ação bactericida a partir de 550 µg mL⁻¹, enquanto se pôde notar ação a partir de 700 µg mL⁻¹ para *E. coli*. Tavichakorntrakool et al., (2019), observou atividade bactericida do extrato etanólico dos rizomas de *A. zerumbet* que apresentou um CBM de 8,0 mg mL⁻¹ frente a *S. aureus* e para a *E. coli* uma CBM de 16,0 mg mL⁻¹, isso mostra que o OE demonstra uma maior atividade bactericida.

O ensaio para Concentração Fungicida Mínima apontou melhores resultados para o OE frente ao *Aspergillus sp*, observando-se ação fungicida a partir de 520 µg mL⁻¹, enquanto se pôde notar ação a partir de 800 µg mL⁻¹ para *Penicillium sp*. Não foram encontrados na literatura outros resultados para os fungos testados neste estudo.

Castro et al., (2016) destaca que a ação antibacteriana de extratos de plantas do

gênero *Alpinia* pode variar amplamente de acordo com a espécie, partes da planta, origem, método de extração e solvente utilizado. Estes fatores podem interferir na composição química e proporção de metabólitos secundários dos extratos (CZELUSNIAK et al., 2012). Extratos hidroalcoólicos das raízes de *A. officinarum* determinaram ação sobre *S. aureus*, proporcionalmente superior àquela induzida pelo extrato etanólico de *A. zerumbet* (SRIVIDYA et al., 2010). Extratos metanólicos e aquosos de *A. allughas* e *A. calcarata* induziram maiores inibições sobre *S. aureus*, quando preparados a partir das raízes em comparação com aqueles produzidos com folhas das mesmas espécies (Bhunja & Mondal, 2012). No entanto, a elaboração de extratos a partir de folhas tem a vantagem de promover a sobrevivência da planta (Pinho et al., 2012), sendo, portanto, uma prática sustentável que deve ser estimulada.

Com os resultados obtidos neste estudo e com os obtidos na literatura, pode-se concluir que o OE das folhas de *A. zerumbet* demonstra um grande potencial antimicrobiano, em comparação aos potenciais do extrato das folhas quanto de outras partes da planta, visto que também é uma prática sustentável por permitir que a planta também sobreviva.

3.4. Toxicidade

Na Tabela 4 estão dispostos os resultados referentes aos percentuais de mortalidade obtidos frente ao OE no bioensaio com *Artemia salina* Leach.

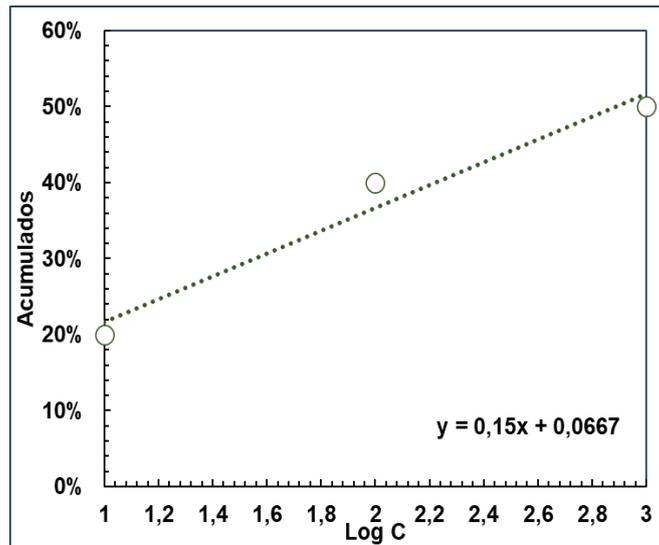
Tabela 4: Percentual de mortalidade das espécies de *Artemia salina* frente à ação do OE

Concentração (C) (mg/L)	Log C	n Mortos	n Vivos	Acumulados		Mortalidade (%)
				Vivos	Mortos	
1000	3	5	5	5	11	50%
100	2	4	6	11	6	40%
10	1	2	8	19	2	20%

Fonte: Autores

A Figura 1 apresenta o gráfico de percentual mortos versus logaritmo para o OE seguindo o método de Pizzi (1950).

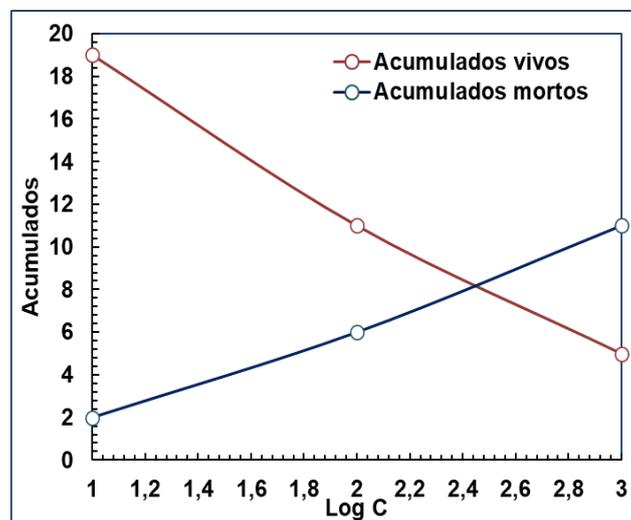
Figura 1: Percentual de mortalidade de *Artemia salina* versus o log da concentração do OE



Fonte: Autores

Na Figura 1 é possível observar a equação obtida em $y=0,15x+0,667$ ($R^2=0,9980$), sendo possível realizar o cálculo do intervalo de confiança. A Figura 2 apresenta o gráfico de acumulados versus logaritmo para o OE seguindo o método de Reed & Muench (1938), respectivamente.

Figura 2: Gráfico log da concentração do OE versus os acumulados de *Artemia salina*



Fonte: Autores

Na Figura 2 é possível observar a intersecção das curvas que corresponde ao log da dose que elimina 50% dos organismos.

Na Tabela 5 são apresentadas as Concentrações Letais 50%, referentes à ação do OE frente a *Artemia salina* L. e sua posterior classificação segundo o critério de Dolabela (1997).

Tabela 5: Concentração Letal 50% para ação do OE frente à *Artemia salina* L.

Log da intersecção das curvas	CL ₅₀ mg L ⁻¹	Classificação
2,46	280,40 ± 10,15	Atóxico

Fonte: Autores

Conforme os resultados apresentados na Tabela 5 pode-se observar que o OE não é classificado como tóxico pelo critério de Dolabella (1997), pois através da Figura 4 observou-se a CL₅₀ de 280,2 mg L⁻¹. Os estudos da toxicidade são de suma importância, pois fornecem informações sobre a qualidade do ambiente ou parte dele, possibilitando assim mensurar qual a concentração letal de um determinado produto (Botelho et al., 2010).

A atoxicidade encontrada para o OE desta espécie traz um avanço com relação aos estudos de aplicação de *A. zerumbet*, visto que a toxicidade dessa espécie é relatada para o extrato por Santos et al., (2010) utilizando a mesma metodologia com *Artemia salina* L. em que o extrato etanólico de *A. zerumbet* apresentou uma toxicidade significativa. O mesmo foi encontrado por Correa et al., (2010), em que testes realizados com o rizoma da *A. zerumbet* também demonstraram uma toxicidade significativa.

O estudo de Santos Junior et al., (2019) colabora para a confirmação da atoxicidade do OE observada neste estudo empregando o bioensaio de *Artemia salina* L., onde os seus OE's obtidos da secagem das folhas em temperaturas diferentes foram classificados como atóxicos.

4. Considerações Finais

O OE das folhas de *A. zerumbet* apresentou resultados satisfatórios frente a todos os microrganismos testados. Além disso, totalizou um quantitativo relevante de fenólicos totais, 413,18 mg EAT g⁻¹, e apresentou-se como atóxico, portanto possui um importante potencial na produção de novos compostos antibióticos e antibacterianos.

Referências

Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S & Chinou IB. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(9), 4168-4170.

Aquino LCL, Santos GG, de Cassia Trindade R, Alves JAB, Santos PO, Alves PB & de Carvalho LM. (2010). Antimicrobial activity of essential oils of cidreira-herb and basil against bacteria from bovine meat/Atividade antimicrobiana dos oleos essenciais de erva-cidreira e manjericao frente a bacterias de carnes bovinas. *Alimentos e Nutricao (Brazilian Journal of Food and Nutrition)*, 21(4), 529-536.

Barbosa LN, da Silva Probst I, Andrade BFMT, Alves FCB, Albano M, de Souza MDLR & Júnior AF. (2015). In vitro antibacterial and chemical properties of essential oils including native plants from Brazil against pathogenic and resistant bacteria. *Journal of oleo science*, 64(3), 289-298.

Barcelos FF, Oliveira ML, Giovaninni NPB, Lins TP, Filomeno CA, Schneider SZ & Andrade TU. (2010). Estudo químico e da atividade biológica cardiovascular do óleo essencial de folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Burt & RM Sm. em ratos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 12(1), 48-56.

Botelho RG, Inafuku MM, Maranhão LA, Neto LM, de Olinda RA, Dias CT & Tornisielo VL. (2010). Toxicidade aguda e crônica do extrato de nim (*Azadirachta indica*) para *Ceriodaphnia dubia*. *Pesticidas: revista de ecotoxicologia e meio ambiente*, 20.

Bhunja D & Mondal AK. (2012). Antibacterial activity of *Alpinia L.* (Zingiberaceae) from Santal and Lodha tribal areas of Paschim Medinipur district in eastern India. *Advances in Bioresearch*, 3(1).

Bruning MCR, Mosegui GBG & Vianna CMDM. (2012). A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. *Ciência & saúde coletiva*, 17, 2675-2685.

Castro KNDC, Lima DF, Vasconcelos LC, Santos RC, Pereira AML, Fogaça FHDS & Calvet RM. (2016). Composição química e eficácia do óleo essencial e do extrato etanólico de *Alpinia zerumbet* sobre *Staphylococcus aureus*. *Arquivos do Instituto Biológico*, 83.

Correa AJC, Lima CE & Costa MCCD. (2010). *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Burt & RM Sm.(Zingiberaceae): levantamento de publicações nas áreas farmacológica e química para o período de 1987 a 2008. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 12(1), 113-119.

Chompoo J, Upadhyay A, Fukuta M & Tawata S. (2012). Effect of *Alpinia zerumbet* components on antioxidant and skin diseases-related enzymes. *BMC complementary and alternative medicine*, 12(1), 106.

CLSI (2020). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Approved Standard 30 Edition, 32.

Czelusniak KE, Brocco A, Pereira DF & Freitas GBL. (2012). Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 14(2), 400-409.

Dolabella MF. (1997). *Triagem in vitro para a atividade antitumoral e anti-T. cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e sintéticos* (Doctoral dissertation, tese de mestrado, Belo Horizonte Universidade Federal de Minas Gerais).

Elzaawely AA, Xuan TD, Koyama H & Tawata S. (2007). Antioxidant activity and contents of essential oil and phenolic compounds in flowers and seeds of *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Burt. & RM Sm. *Food chemistry*, 104(4), 1648-1653.

Elzaawely AA, Xuan TD & Tawata S. (2007). Changes in essential oil, kava pyrones and total phenolics of *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Burt. & RM Sm. leaves exposed to copper sulphate. *Environmental and experimental botany*, 59(3), 347-353.

FARMACOPEIA BRASILEIRA (2019). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 6 ed., p.92.

Furtado JM, da Silva Amorim Á, de Macedo Fernandes MV & Oliveira MAS. (2015). Atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *Eucalyptus globulus*, *Justicia pectoralis* e *Cymbopogon citratus* frente a bactérias de interesse. *Journal of Health Sciences*, 17(4).

Gobbo-Neto L & Lopes NP. (2007). Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química nova*, 30(2), 374-381.

Juergens UR, Stöber M, Schmidt-Schilling L, Kleuver T & Vetter H. (1998). Antiinflammatory effects of euclyptol (1.8-cineole) in bronchial asthma: inhibition of arachidonic acid metabolism in human blood monocytes ex vivo. *European journal of medical research*, 3, 407-412.

Kerdudo A, Ellong EN, Burger P, Gonnot V, Boyer L, Chandre F & Fernandez X. (2017). Chemical composition, antimicrobial and insecticidal activities of flowers essential oils of *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Burtt & RM Sm. from Martinique Island. *Chemistry & biodiversity*, 14(4), e1600344.

Kriek C, Finatto T, Müller TS, Guerra MP & Orth AI. (2008). Biologia reprodutiva de *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Burtt & RM Sm.(Zingiberaceae) em Florianópolis, Santa Catarina. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 10(2), 103-110.

Liao JC, Deng JS, Chiu CS, Hou WC, Huang SS, Shie PH & Huang GJ. (2012). Anti-inflammatory activities of *Cinnamomum cassia* constituents in vitro and in vivo. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.

Lorenzi H & Souza HM. (2001). *Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras*. São Paulo: Instituto Plantarum.

Mendes FR, Silva FG, Sousa EO, Rodrigues FF, Costa JG, Monte FJ & Assunção JC. (2015). Essential oil of *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Burtt. & RM Sm.(Zingiberaceae): chemical composition and modulation of the activity of aminoglycoside antibiotics. *Journal of Essential Oil Research*, 27(3), 259-263.

Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DJ & McLaughlin JL. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta medica*, 45(05), 31-34.

Moreira MR, Ponce AG, Del Valle CE & Roura SI. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT-Food Science and Technology*, 38(5), 565-570.

Morita D. (1992). Insecticides and bactericide made of sell flower essential oil. *U.S. Patent No. 5,110,594*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Natta L, Orapin K, Krittika N & Pantip, B. (2008). Essential oil from five Zingiberaceae for anti food-borne bacteria. *International Food Research Journal*, 15(3), 337-346.

Pinho LD, Souza PNS, Macedo Sobrinho E, Almeida ACD & Martins ER. (2012). Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. *Ciência Rural*, 42(2), 326-331.

Pizzi M. (1950). Sampling variation of the fifty per cent end-point, determined by the ReedMuench (Behrens) method. *Human biology*, 22(3), 151-190.

Reed LJ & Muench H. (1938) A Simple Method of Estimating Fifty Percent Endpoints. *American Journal of Hygiene*, 27, 493-497.

Rezende MED, Jasmim JM, Caprini GP, Sousa EFD, Schripsema J & Thiébaud JTL. (2011). Teor e composição química do óleo essencial de alpinia em razão da adubação e da disponibilidade de água no solo. *Revista Ceres*, 58(2), 208-215.

Santos CP, de Lira Lemos RP & dos Santos AF. (2010). Avaliação da toxicidade das espécies medicinais *Alpinia zerumbet* (Pers.) e *Sambucus australis* Cham. & Schltdl. frente *Artemia salina* Leach. *Revista Ambientale*, 2(2), 65-76.

Santos FA & Rao VSN. (2000). Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1, 8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytotherapy Research: An*

International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 14(4), 240-244.

Santos Júnior PS, Villa-Velez HA, Everton GO, Teles A, Mouchrek AN & Mouchrek Filho VE. (2019). Predição de modelos matemáticos sobre a cinética de secagem das folhas de alpinia zerumbet (jardineira) e influência da temperatura nas propriedades e toxicidade do seu óleo essencial. In: *XXXIX CONGRESSO BRASILEIRO DE SISTEMAS PARTICULADOS ENEMP*.

Sarto MPM & Junior GZ. (2014). Atividade antimicrobiana de óleos essenciais. *Revista UNINGÁ Review*, 20(1).

Satou T, Murakami S, Matsuura M, Hayashi S & Koike K. (2010). Anxiolytic effect and tissue distribution of inhaled *Alpinia zerumbet* essential oil in mice. *Natural product communications*, 5(1), 1934578X1000500133.

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA & Petrovick PR.(Orgs). (2010). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre. Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC.

Singh HP, Kaur S, Negi K, Kumari S, Saini V, Batish DR & Kohli RK. (2012). Assessment of in vitro antioxidant activity of essential oil of *Eucalyptus citriodora* (lemon-scented Eucalypt; Myrtaceae) and its major constituents. *LWT-Food science and Technology*, 48(2), 237-241.

Srividya AR, Dhanabal SP, Misra VK & Suja G. (2010). Antioxidant and antimicrobial activity of *Alpinia officinarum*. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 72(1), 145.

Tavichakortrakool R, Lulitanond A, Sangka A, Sungkeeree S & Weerapreeyakul N. (2019). Antibacterial activity and bioactive compounds of 50% hydroethanolic extract of *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Burtt & RM Sm. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 9(5), 204.

Victório CP, Alviano DS, Alviano CS & Lage CL. (2009). Chemical composition of the fractions of leaf oil of *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Burtt & RM Sm. and antimicrobial activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(3), 697-701.

Vitti AMS & Brito, J. O. (2003). Óleo essencial de eucalipto. *Documentos florestais*, 17, 1-35.

Souza JLD. (2018). Perfil químico e avaliação da atividade antioxidante dos extratos da *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burtt & Smith.

Waterhouse A. (2018). Folin-Ciocalteu micro method for total phenol in wine. 2012. *Accessed on January*, 5.

Xuan TD, Quan N, Quan NT, Rayee R, Khanh TD, Tran HD & Trung NT. (2019). Allelopathic Plants: 26. *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Burtt & RM Sm.(Zingiberaceae). *Allelopathy Journal*, 48(1), 1-13.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Matheus dos Santos Ribeiro – 10%

Gustavo Oliveira Everton – 10%

Paulo Victor Serra Rosa – 10%

Erick Rickman Nascimento Pimenta – 7,14%

Ari Pereira de Araújo Neto – 7,14%

Andressa Almeida Santana Dias – 7,14%

Ana Patrícia Matos Pereira – 10%

Dorileia Pereira do Nascimento – 7,14%

Ana Maria Almeida Silva Carvalho – 7,14%

Leila da Silva Silveira – 7,14%

Irlane Thais Pereira de Sousa – 7,14%

Victor Elias Mouchrek Filho – 10%