

## Atividade antimicrobiana do extrato alcoólico de *Valeriana officinalis* L. frente a bactérias de isolados clínicos.

## Antimicrobial activity of the alcoholic extract of *Valeriana officinalis* L. against bacteria from clinical isolates.

### RESUMO

A *Valeriana officinalis* L. é uma planta pertencente à família das *Caprifoliaceae*. Suas raízes e partes subterrâneas são as partes mais utilizadas para fins medicinais, empregada como sedativo leve ou moderado, bem como no tratamento de insônia associada a ansiedade. Este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do extrato alcoólico de *V. officinalis* L. sobre bactérias de isolados clínicos, dada a constante necessidade do estudo de novas substâncias bioativas eficazes no tratamento de doenças infecciosas. Para isso, avaliou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato vegetal através do método de microdiluição em caldo e “spot test”, respectivamente. As bactérias analisadas foram *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*. Os resultados demonstraram que o extrato de valeriana exerceu ação inibitória para todas as bactérias testadas, sendo que a bactéria *P. aeruginosa* demonstrou maior sensibilidade. Enquanto isso, o teste de CBM demonstrou que o extrato teve maior atividade bactericida para a *E. coli* com morte total bacteriana. Portanto, o extrato de valeriana pode ser uma alternativa de substância bioativa efetiva na atividade antibacteriana, necessitando de estudos mais aprofundados quanto ao seu uso.

**PALAVRAS-CHAVE:** Extratos naturais. Compostos bioativos. Bactericida.

### ABSTRACT

*Valeriana officinalis* L. is a plant belonging to the *Caprifoliaceae* family. Its roots and subterranean parts are the parts most used for medicinal purposes, used as a mild or moderate sedative, as well as in the treatment of insomnia associated with anxiety. This work aimed to evaluate the antimicrobial activity of the alcoholic extract of *V. officinalis* L. on bacteria from clinical isolates, given the constant need to study new bioactive substances effective in the treatment of infectious diseases. For this, the Minimum Inhibitory Concentration (CIM) and Minimum Bactericidal Concentration (CBM) of the plant extract were evaluated using the broth microdilution method and spot test, respectively. The analyzed bacteria were *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens*. The results showed that the valerian extract had an inhibitory action for all the tested bacteria, and the *P. aeruginosa* bacterium showed greater sensitivity. Meanwhile, the CBM test demonstrated that the extract had greater bactericidal activity for *E. coli* with total bacterial death. Therefore, valerian extract can be an alternative of bioactive substance effective in antibacterial activity, requiring further studies regarding its use.

**KEYWORDS:** Natural extracts. Bioactive compounds. Bactericidal.

Mariana Klein Bomfin

[Kleinmariana97@gmail.com](mailto:Kleinmariana97@gmail.com)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Cleverson Busso

[cleversonbusso@utfpr.edu.br](mailto:cleversonbusso@utfpr.edu.br)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Letícia Scussel de Farias

[Letisf27@gmail.com](mailto:Letisf27@gmail.com)

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

**Recebido:** 19 ago. 2020.

**Aprovado:** 01 out. 2020.

**Direito autoral:** Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



## 1 INTRODUÇÃO

A valeriana (*Valeriana officinalis* L.) é uma planta pertencente à família das *Caprifoliaceae* distribuída em regiões temperadas da Ásia e Europa. A espécie é encontrada em florestas úmidas e cultivada para fins medicinais principalmente na Bélgica, Inglaterra, França, Japão, Holanda e Estados Unidos (BRASIL, 2016; WHO, 1999).

As raízes e partes subterrâneas secas da planta são as partes mais utilizadas para fins medicinais. A valeriana pode ser empregada como sedativo leve ou moderado, bem como utilizada no tratamento de insônia associada a ansiedade com atividade comprovada por dados clínicos. Além disso, é descrita em farmacopeias como auxiliar digestivo e adjuvante como antiespasmódico e nas dores gastrointestinais de origem nervosa (WHO, 1999; PDR, 2000).

A composição química da *V. officinalis* L. pode variar de acordo com a idade da planta, localização, condições de crescimento e subespécie. Os principais componentes são os valepotriatos, constituídos principalmente de epóxi-iridóides, como o valtrato e isovaltrato e os sesquiterpenos como o ácido valerênico que apresenta efeito sobre o sistema nervoso central. Além disso, possui o óleo volátil composto pelo isovalerenato de bornil e ácido isovalerênico responsáveis pelo odor característico da planta. Também possui alcalóides de piridina e derivados do ácido cafeico (WHO, 1999; ANSIVAL, 2011).

Portanto, devido às características do gênero *Valeriana* esse trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do extrato de *V. officinalis* L. sobre bactérias de isolados clínicos, dada a constante necessidade de estudo de novas substâncias bioativas eficazes no tratamento de doenças infecciosas.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 LINHAGENS

As cepas utilizadas neste experimento foram cedidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ. As cepas foram obtidas a partir de isolados clínicos: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Clostridium perfringens* (ATCC 3624).

### 2.2 EXTRATO DE VALERIANA OFFICINALIS

Para o preparo do extrato alcóolico diluiu-se 1g do chá de *V. officinalis* em 25mL de álcool 99,5% em um erlenmeyer de 125mL, vedado com parafilme e protegido da luz com papal alumínio. Em seguida, manteve-se a solução em *shaker* sob agitação orbital de 200 rpm e 40°C durante 24 horas.

Posteriormente, filtrou-se a vácuo a solução para separação dos sólidos e realizou-se a rotaevaporação a 37°C. Após a evaporação do solvente realizou-se uma ressuspensão do extrato restante no balão do rotaevaporador adicionando-

se 10mL de álcool e ajustou-se o volume final do extrato obtido. Por fim, o extrato alcoólico de *V. officinalis* foi armazenado em frascos âmbar em freezer a -20°C.

### 2.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) NAS BACTÉRIAS

A CIM é definida como a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento microbiano. Para o teste de CIM nas bactérias seguiu-se a padronização estabelecida pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (NCCLS, 2003).

Para a determinação da CIM, inicialmente, preparou-se o inóculo para as bactérias *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* e *C. perfringens*. Para isso, inoculou-se cada bactéria em 5mL de caldo Mueller Hinton (MH) em um tubo falcon de 15mL e adicionou-se os tubos em *shaker* sob agitação de 150 rpm a 35°C durante 6 horas. Após o período de incubação, ajustou-se o inóculo na escala 0,5 McFarland e em seguida distribuídos alíquotas em microplaca de 96 poços, dispostos em 12 colunas (1 a 12) e 8 linhas (A - H). Sendo que, em cada placa analisou-se dois microrganismos.

Em seguida, adicionou-se 100µL do meio MH e 100µL de extrato no primeiro poço obtendo-se uma diluição de 1:1 (50% do extrato) e realizou-se a diluição seriada em 12 poços da microplaca através da transferência de 100µL do conteúdo do primeiro ao último poço. Além disso, para o controle do crescimento adicionou-se o caldo com o inóculo e para controle da esterilidade adicionou-se o meio de cultivo e o álcool utilizado para preparo do extrato, dispostos nas linhas G e H.

As microplacas foram incubadas a 35°C por 24 horas e, posteriormente, acrescentou-se 20µL de uma solução aquosa de resazurina e a incubou novamente por 2 horas a 35°C. A análise das placas foi realizada visualmente através da coloração, sendo que a cor azul indica que houve inibição das células, enquanto a cor rosa que ainda há células viáveis.

### 2.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) NAS BACTÉRIAS

A Concentração Inibitória Mínima (CBM) é definida como a menor concentração do extrato com capacidade bactericida, ou seja, eliminar o crescimento bacteriano totalmente. Para a determinação da CBM utilizou-se o método “*spot test*”. Para isso, preparou-se placas de petri com meio ágar Mueller Hinton.

Com a orientação de um papel milimetrado, inoculou-se 5µL dos poços na placa. Sendo que, a primeira fileira é composta pelo grupo controle da microplaca (fileira G e coluna 1 ao 6), a segunda e terceira fileira são compostas pela fileira B e C da microplaca. A quarta fileira referente ao grupo controle do segundo microrganismo inoculado (fileira H e coluna 1 ao 6) e as últimas fileiras são compostas pela fileira E e F da microplaca.

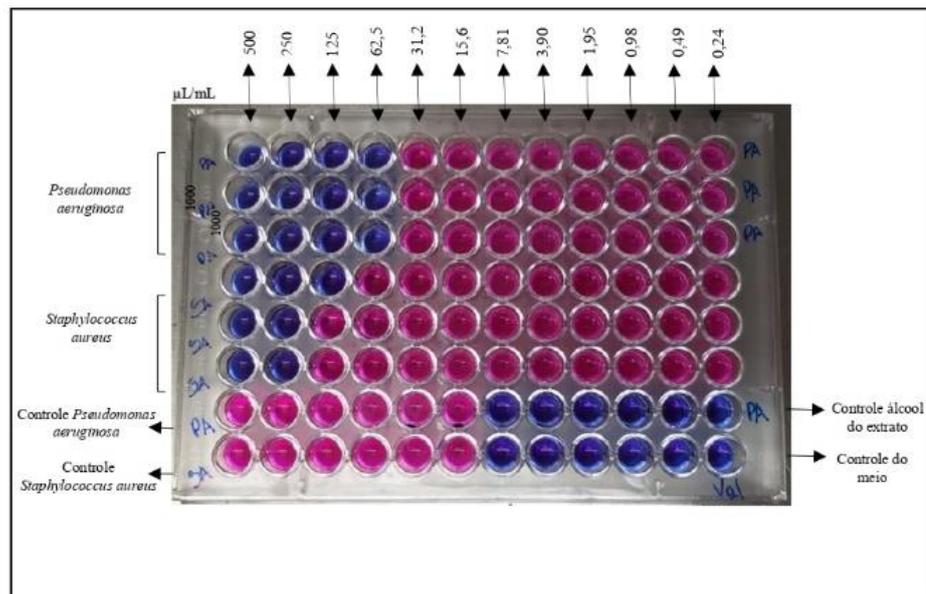
Assim, avaliou-se a capacidade bactericida e bacteriostática das concentrações de extrato. As concentrações que obtiveram inibição na microplaca

e crescimento bacteriano na placa indicaram ação bacteriostática, ou seja, somente inibiram o crescimento. Enquanto, a não formação de colônias indica ação bactericida, portanto não houve crescimento bacteriano.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

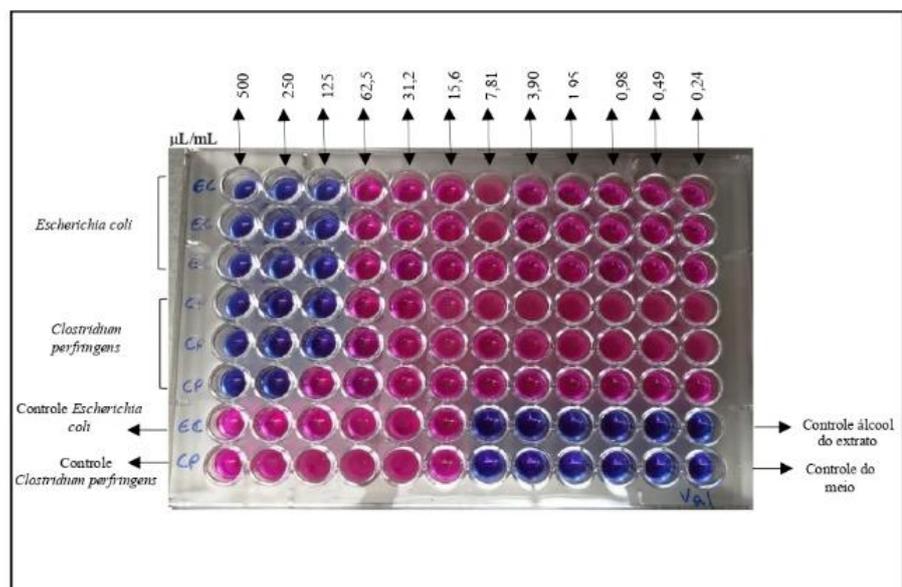
As figuras 1 e 2 apresentam os resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das bactérias testadas para o extrato vegetal.

Figura 1 - CIM do extrato vegetal de *V. officinalis* sob as bactérias *P. aeruginosa* (PA) e *S. aureus* (SA).



Fonte: autoria própria (2020)

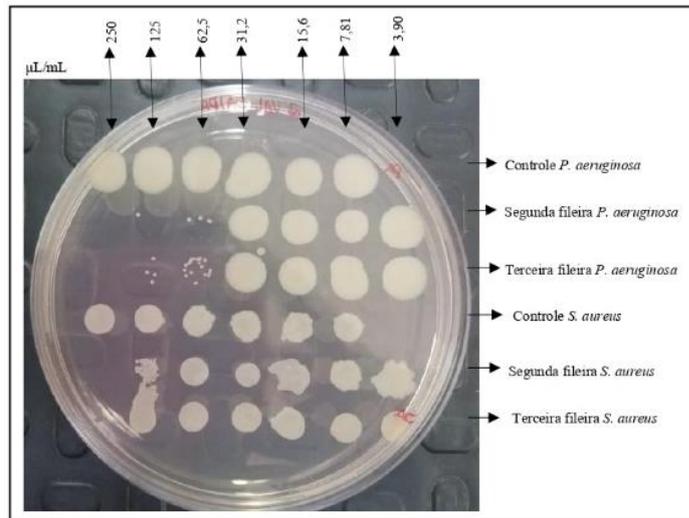
Figura 2 - CIM do extrato vegetal de *V. officinalis* sob as bactérias *E. coli* (EC) e *C. perfringens* (CP).



Fonte: autoria própria (2020)

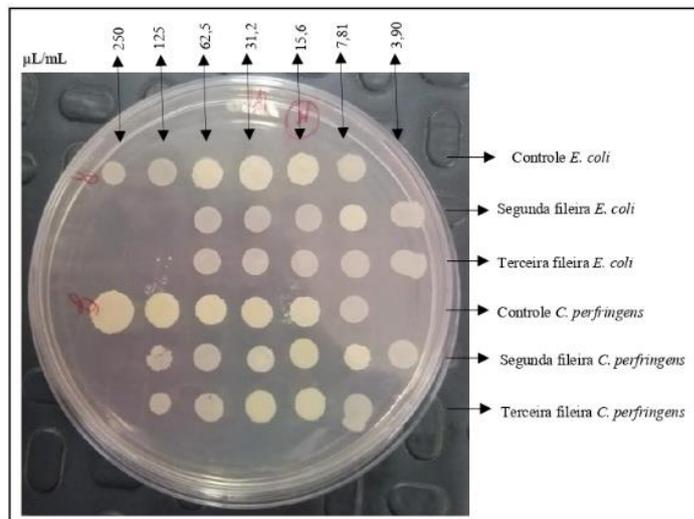
A figura 3 e 4 apresentam os resultados da CBM através do método “spot test”.

Figura 3. CBM do extrato vegetal de *V. officinalis* sob as bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus*.



Fonte: autoria própria (2020)

Figura 4. CBM do extrato vegetal de *V. officinalis* sob as bactérias *E. coli* e *C. perfringens*.



Fonte: autoria própria (2020)

A CIM e a CBM do extrato vegetal da *V. officinalis* estão representadas na tabela 1.

Tabela 1 - CIM do extrato vegetal para as bactérias avaliadas.

Bactérias	Extrato vegetal ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )		Antibióticos ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )			
	CIM	CBM	Ampicilina		Gentamicina	
			CIM	CBM	CBM	CIM
<i>P. aeruginosa</i>	62,5	250	Resistente	Resistente	0,39	0,39
<i>S. aureus</i>	250	250	0,097	0,097	0,048	0,097
<i>E. coli</i>	125	125	1,56	3,12	0,19	0,19
<i>C. perfringens</i>	125	250	*	*	*	*

Fonte: Cleverson Busso – Antibióticos (2017) e autoria própria – Valeriana officinalis (2020)

Os resultados demonstram que o extrato vegetal de *V. officinalis* apresentou ação inibitória para todas as cepas testadas. A bactéria *P. aeruginosa* demonstrou uma maior sensibilidade com uma CIM de 62,5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (Figura 1). Enquanto isso, as bactérias *E. coli* (Figura 2) e *C. perfringens* (Figura 2) apresentaram CIM de 125  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . A bactéria *S. aureus* (Figura 1) apresentou a menor sensibilidade ao extrato somente com a CIM de 250  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (Tabela 1).

A CIM representa a menor concentração de extrato capaz de inibir o desenvolvimento bacteriano, sendo que os valores inferiores a 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  apresentam potencial antimicrobiano promissor, entre 100 e 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$  potencial moderado, entre 500 e 1000  $\mu\text{L}/\text{mL}$  fraca ação inibitória e acima de 1000  $\mu\text{L}/\text{mL}$  não apresenta capacidade inibitória para os patógenos. Portanto, o extrato alcoólico de chá de valeriana apresentou ação inibitória moderada para *E. coli*, *C. perfringens* e *S. aureus* e potencial promissor para a bactéria *P. aeruginosa* (BONA, 2014; SIMONETTI, 2016; HOLETZ, 2002).

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) define a menor concentração do extrato testado capaz de causar a morte do inóculo [2]. O “spot test” é uma análise complementar a fim de identificar se houve somente efeito bacteriostático ou bactericida. Na figura 4 é possível visualizar que o extrato teve maior atividade bactericida para a bactéria *E. coli* com morte total bacteriana na concentração de 125  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Enquanto para as três outras bactérias a CBM é de 250  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , ou seja, é necessária uma maior concentração de extrato para a morte desses inóculos.

LETCHAMO (2004) apresentou em seu trabalho a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *V. officinalis* L. de dois diferentes cultivares (anthos e select). O óleo de valeriana do tipo select demonstrou forte efeito antimicrobiano contra *Aspergillus niger*, *E. coli*, *S. aureus* e *Saccharomyces cerevisiae*. Entretanto, nenhum dos óleos apresentou capacidade de inibição da bactéria *P. aeruginosa*. Portanto, associando com os resultados descritos na tabela 1, o extrato obtido neste experimento pode ser mais efetivo na ação contra essa bactéria.

RONDÓN (2018) avaliou a atividade antimicrobiana de diferentes espécies de valeriana e demonstrou que o extrato de N-hexano da *V. triplinervis* e *V. rosaliana* foram mais eficientes contra a bactéria *S. aureus*. Além disso, sugeriu que os extratos metanólicos e aquosos podem ter ação antibacteriana mais forte em relação a outros extratos.

A composição e atividade antimicrobiana varia significativamente de acordo com a origem biológica (cultivar) e estágio de desenvolvimento da planta e época de colheita (LETCHAMO, 2004). Além disso, a forma de preparar o material para

estudo e os protocolos seguidos no experimento podem dificultar a comparação entre estudos de atividade antimicrobiana de extratos vegetais (ALVES, 2008).

Os resultados apresentam resultados interessantes quanto a ação antimicrobiana do extrato obtido de *V. officinalis*, oferecendo perspectivas para outros estudos complementares, principalmente também, em outras bactérias de interesse clínico.

#### 4 CONCLUSÃO

O extrato alcoólico da *V. officinalis* apresenta potencial de inibição e atividade bactericida para as bactérias de interesse clínico avaliadas. A bactéria *P. aeruginosa* demonstrou maior sensibilidade frente ao extrato, o que é um resultado interessante, uma vez que esta cepa se apresentou resistência ao antibiótico ampicilina. Portanto, o extrato estudado pode ser uma alternativa de uma substância bioativa para o controle de doenças infecciosas causadas por bactérias, necessitando de estudos mais aprofundados quanto ao seu uso.

#### 5 AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ pelo fornecimento das cepas bacterianas utilizadas neste trabalho. Também agradecemos a UTFPR campus Toledo pelo espaço e oportunidade de realização das atividades.

#### 6 REFERÊNCIAS

ALVES, E. G. et al. estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **química nova**, são paulo, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

ANSIVAL: extrato seco de Valeriana officinalis L. São Paulo: Ativus Farmacêutica Ltda, 2011. Bula de remédio. Disponível em: <https://www.saudedireta.com.br/catinc/drugs/bulas/ansival.pdf>.

BONA, E. A. M. et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/aib/v81n3/1808-1657-aib-81-03-00218.pdf>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Memento Fitoterápico: Farmacopeia Brasileira**. 1. ed. Brasília, DF: ANVISA, 2016. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/formulario-fitoterapico/arquivos/8080json-file-1>.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio DE Janeiro, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S007402762002000700017](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S007402762002000700017).

LETCHAMO, Wudeneh et al. Essential oil of *Valeriana officinalis* L. cultivars and their antimicrobial activity as influenced by harvesting time under commercial organic cultivation. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 12, p. 3915-3919, 2004.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

PHYSICIANS DESK REFERENCE. PDR for herbal medicines. 2. ed. Montvale: Medical Economics Company, p. 783-786, 2000.

RONDÓN, M. et al. Antimicrobial activity of four *Valeriana* (Caprifoliaceae) species endemic to the Venezuelan Andes. *Revista Biología Tropical*, Venezuela, v. 66, n. 3, p. 1282-1289, 2018.

SIMONETTI, E. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente a *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, Campinas, v. 18, n. 1, p. 9-18, 2016. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-05722016000100009&script=sci\\_abstract&tlng=pt](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-05722016000100009&script=sci_abstract&tlng=pt).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Who monographs on selected medicinal plants. Geneva, Switzerland: World Health Organization, v. 1, p. 267-276, 1999.