

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE ÓLEOS ESSENCIAIS FRENTA A ISOLADOS CLÍNICOS DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP.

KAMILA FURTADO DA CUNHA¹; MATHEUS HENRIQUE VARGAS²; ANGELITA
MILECH²; PRISCILA KRÜGER VOIGT²; GLADIS AVER RIBEIRO³

¹ Universidade Federal de Pelotas-IB – kamilafurtado1@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas-IB – atf17.matheus@hotmail.com; angelitamilech@gmail.com
privoigt@hotmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas -IB– gladisaver@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Bactérias como *Staphylococcus* spp. fazem parte da microbiota normal da pele e membranas mucosas em seres humanos e outros animais, entretanto, são considerados como importantes patógenos oportunistas, podendo causar desde simples infecções de pele até doenças sistêmicas, como sepse. Há algum tempo são considerados como um problema crescente em ambientes hospitalares devido a seus vários fatores de virulência, fácil disseminação e possibilidade de resistência a diversos antibacterianos. Atualmente, os estafilococos multirresistentes são um dos principais agentes causadores de infecções nosocomiais estando associados a consideráveis taxas de morbidade e mortalidade (MURRAY, 2009; OLIVEIRA, 2007; RODRIGUES, 2011).

Devido ao aumento na incidência de bactérias multirresistentes em ambientes hospitalares se faz necessário buscar novas alternativas que possam ser eficientes no tratamento e controle desses agentes infecciosos. Tendo em vista essa necessidade, muitos extratos vegetais, como os óleos essenciais (OE) são avaliados quanto ao seu potencial antibacteriano (PROBST, 2012).

Os OE são oriundos do metabolismo secundário vegetal, apresentam uma composição variável e complexa, mas seus principais compostos são os terpenos e seus derivados oxigenados, terpenóides e compostos fenólicos, sendo estes os responsáveis pela sua ação antibacteriana (SOLÓRZANO-SANTOS e MIRANDA-NOVALES, 2011). Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial antibacteriano de óleos essenciais frente a isolados clínicos de *Staphylococcus* spp.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados três óleos essenciais, sendo eles cravo botão (*Eugenia caryophyllus* (Spreng) Bullock & S.G. Harrison), tangerina cravo (*Citrus reticulata* Blanco) e eucalipto citriodora (*Corymbia citriodora* (Hook.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson), os quais foram adquiridos comercialmente, e foram utilizados isolados clínicos de *Staphylococcus* spp. cedidos pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Escola da Universidade Federal de Pelotas. Foram utilizadas três cepas de *S. aureus* e dez de *Staphylococcus* coagulase negativa, e como controle foram utilizadas *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 35984. Os testes foram realizados no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas.

A Técnica de Difusão em Disco segundo o NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*, 2015) foi utilizada para avaliar o potencial biológico dos óleos essenciais frente aos isolados bacterianos. Para a realização do teste foram adicionados 10 µL dos OE sobre discos de papel filtro estéreis. Como

controle negativo, foram utilizados discos de papel filtro contendo 10 µL de água destilada estéril, e como controle positivo discos de Gentamicina (10µg), sendo incubados a 36°C por 24h. Após o período de incubação foi verificada a formação de um halo de inibição ao redor dos discos com óleo essencial.

Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo (NCCLS, 2015) utilizando o Caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Acumedia®), acrescido do emulsificante Tween 80 (T80-Vetec®) a 1%. Foram feitas diluições do OE no meio variando de 25% a 0,019%. Como controle negativo foi utilizado meio de cultura sem adição de inóculo, e o meio de cultura com a adição do inóculo foi usado como controle positivo do crescimento bacteriano. Para controle de esterilidade do OE, foi utilizado óleo essencial e meio de cultura. Os testes foram realizados em triplicata e incubados a 36°C por 24h. Após a incubação foi adicionado 20µL do reagente Cloreto de Trifenil Tetrazólio a 0,5% em todas as cavidades da placa a fim de verificar possível atividade antibacteriana.

A partir da CIM foi determinada a Concentração Bactericida Mínima (CBM), sendo semeada uma alçada de todas as cavidades que demonstram inibição do crescimento em placas contendo Ágar BHI. Após a incubação foi possível determinar quais concentrações inibiram ou impediram o crescimento bacteriano (NCCLS, 2015).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os óleos essenciais avaliados apenas cravo botão demonstrou ação biológica frente aos isolados testados, inibindo seu crescimento no teste de Difusão em Disco, sendo este utilizado para determinar a CIM e CBM. GERHARDT et al (2012) também observaram que a ação do OE de tangerina cravo contra *S. aureus* ATCC 25923 não foi significativa, sendo semelhante ao resultado obtido no presente trabalho. Em contrapartida, no trabalho realizado por ESTANISLAU et al (2001) observou-se ação do OE de eucalipto contra *S. aureus*, diferente dos resultados obtidos em nosso estudo, que pode ser devido a variações na composição química dos OE de acordo com a espécie vegetal, condições ambientais que esta se encontra e forma de extração (LUCENA, 2015).

Os resultados obtidos com relação à CIM e CBM estão na tabela abaixo (Tabela 1), demonstrando que o OE de cravo botão apresentou ação inibitória e bactericida em suas menores concentrações. Nota-se que o óleo essencial apresentou ação bactericida contra 73,3% dos isolados testados em sua menor concentração, sendo esta 0,019%. Os maiores valores de CBM e CIM foram de 0,078% e 0,039%, respectivamente.

Tabela 1: Concentração Inibitória Mínima e Bactericida Mínima do Óleo Essencial de Cravo botão frente a isolados clínicos de *Staphylococcus* spp.

Isolado	CIM	CBM
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	0,019%	0,039%
<i>Staphylococcus</i> coag. neg. 4	-	0,019%
<i>Staphylococcus</i> coag. neg 5	-	0,019%
<i>Staphylococcus</i> coag. neg 8	-	0,019%
<i>Staphylococcus</i> coag. neg 9	-	0,019%
<i>Staphylococcus</i> coag. neg 10	-	0,019%
<i>Staphylococcus</i> coag. neg 12	-	0,019%

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima; -: ausência de concentração inibitória mínima.

Tabela 1: Concentração Inibitória Mínima e Bactericida Mínima do Óleo Essencial de Cravo botão frente a isolados clínicos de *Staphylococcus* spp.

Isolado	CIM	CBM
<i>Staphylococcus</i> coag. neg 13	-	0,019%
<i>Staphylococcus</i> coag. neg 14	-	0,019%
<i>Staphylococcus</i> coag. neg 16	0,019%	0,039%
<i>Staphylococcus</i> coag. neg 17	0,039%	0,078%
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	0,019%
<i>S. aureus</i> 5	-	0,019%
<i>S. aureus</i> 6	-	0,019%
<i>S. aureus</i> 7	0,019%	0,039%

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima; -: ausência de concentração inibitória mínima.

Resultados semelhantes para CIM foram encontrados por BODNAR et al (2014), onde foi observado que a concentração de 0,5% do óleo essencial foi capaz de inibir o crescimento *S. aureus*, e também de outras bactérias Gram-negativas. SILVISTRI et al (2010) observaram que o OE de cravo botão apresentou uma maior atividade antibacteriana contra *S. aureus*, quando comparado com outras bactérias testadas, obtendo uma CIM de 0,2%mg.mL⁻¹. SCHERER et al (2009) relatam também que o OE de cravo apresentou uma ação antibacteriana, obtendo uma CIM que variou de 0,400 a 0,600 mg.mL⁻¹ quando testado contra *S. aureus*.

Dentre os compostos majoritários do OE de cravo botão, destaca-se o Eugenol, o qual apresenta ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Já foi descrito que esse composto é capaz de reduzir a expressão de importantes fatores de virulência em *S. aureus*, como hemolisinas, enterotoxinas (SEA e SEB), Toxina da Síndrome do Choque Tóxico, além de inibir a formação de biofilme *in vitro*, a qual é um importante fator de virulência também nos *Staphylococcus* coagulase negativa (QIU et al, 2010; YADAV et al, 2015).

4. CONCLUSÕES

Dos três óleos essenciais utilizados contra os isolados clínicos de *Staphylococcus* spp. apenas o de cravo botão (*E. caryophyllus* (Spreng) Bullock & S.G. Harrison) apresentou ação biológica. Observou-se, que para a maioria dos isolados avaliados, esse óleo apresentou ação bactericida em sua menor concentração testada. Sendo assim, pode concluir-se que o óleo essencial de cravo botão apresenta resultados *in vitro* satisfatórios e promissores quanto sua ação antibacteriana, entretanto mais testes são necessários para comprovar sua eficiência.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BODNAR, G. C.; NISHIO, E. K.; KRUPINISKI, M. T.; NAKAZATO G. Ação antimicrobiana do óleo de cravo contra bactérias gram positivas e gram negativas. **Blucher Food Science Proceedings**, v.1, n.1, p.1-2, 2014.
- ESTANISLAU, A. A.; BARROS, F. A. S.; SANTOS, S. C.; FERREI, P. H.; PAULA, J. R. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* cultivados em Goiás. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.11, n.2, p.95-100, 2001.

- GERHARDT, C.; WIEST, J. M.; GIROLETTO, G.; SILVA, M. A. S.; WESCHENFELDER, S. Aproveitamento da casca de citros na perspectiva de alimentos: prospecção da atividade antibacteriana. **Brazilian Journal of Food Technology**. p. 11-17, 2012.
- LUCENA, B. F. F.; TINTINO, S. R.; FIGUEREDO, F. G.; OLIVEIRA, C. D. M.; AGUIAR, J. J. S.; CARDOSO, E. N. C.; AQUINO, P. E. A.; ANDRADE, J. C.; COUTINHO, H. D. M.; MATIAS, E. F. F. Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora de aminoglicosídeos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **Acta Biologia Colombiana**, Bogotá, v. 20, n.1, p. 39-45, 2015.
- MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michel A. *Staphylococcus* e Cocos Gram Positivos Relacionados. In: **Microbiologia Médica**. 6º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 935- 1005.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard M7-A10, 2015.
- OLIVEIRA, A. D. D.; AZEVEDO, P. A.; SOUZA, L. B.; VIANA-NIERO, C.; FRANCISCO, W.; LOTTENBERG, G.; MARTINO, M. D. V.; HOFLING-LIMA, A. L. Laboratory detection for methicillin resistance in coagulase negative *Staphylococcus* isolated from ophthalmic infection. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**. n. 70, v. 4, p. 667-675, 2007.
- PROBST, I. S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação do potencial sinérgico**. 2012. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada)- Curso de Pós Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Universidade Estadual Paulista.
- QIU, J.; FENG, H.; LU, J.; XIANG, H.; WANG, D.; DONG, J.; WANG, J.; WANG, X.; LIU, J.; DENG, X. Eugenol reduces the expression of Virulence-related exoproteins in *Staphylococcus aureus*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.76,n.17, p.5846-5851, 2010.
- RODRIGUES, Marcus Vinicius Pimenta. **Epidemiologia molecular e fatores de risco para a aquisição de clones endêmicas de *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (MRSA) em um hospital de ensino**. 2011. 117f. Dissertação (Doutorado em Doenças Tropicais)- Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Botucatu, 2011.
- SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M. C. T.; GODOY, H. T. Composição e atividade antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 11, n.4, p. 442-449, 2009.
- SILVESTRI, J. D. F.; PAROUL, N.; CZYIEWSKI, E.; LERIN, L.; ROTAVA, I.; CANSIAN, L. R.; MOSSI, A.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Perfil da composição química e atividade antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**. Viçosa, v.75, n.5, p.589-594, 2010.
- SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**. v.23, p.1-6, 2011.
- YADAV, M. K.; CHAE, S. W.; IM, G. J.; CHUNG, J. W.; SONG, J.J. Eugenol: a phyto-compound effective against methucullin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* clinical strains biofilms. **PloS ONE**. v.10, n.3, p.1-21, 2015.