

Avaliação antioxidante, antimicrobiana e antibiofilme dos óleos de palmarosa, cravo e tomilho e seus constituintes majoritários frente a *C. albicans* e *P. aeruginosa* (PA01) em material médico hospitalar

EISENHARDT, E, G¹; VIANNA, H. S²; FREITAG, R, A³;
GIONGO, J, L⁴; VAUCHER, R, A⁵

¹Curso de Farmácia, Universidade Federal de Pelotas – erikaeisenhardt95@gmail.com

²Curso de Farmácia, Universidade Federal de Pelotas – hsilveiravianna@gmail.com

³Curso de Química Forense, Universidade Federal de Pelotas – rafreitag@gmail.com

⁴Curso de Farmácia, Faculdade Anhanguera Pelotas – janicegiongo@hotmail.com

⁵Curso de Farmácia, Universidade Federal de Pelotas – rodvaucher@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, infecções microbianas vêm ganhando destaque devido ao aumento de patologias que afetam o sistema imunológico, como AIDS, câncer, doenças autoimunes entre outras, bem como, o aumento da utilização de material médico hospitalar durante o tratamento desses pacientes. O Ministério da Saúde aponta que mais de 70% dos microrganismos que causam infecções hospitalares no Brasil apresentam resistência a pelo menos um antimicrobiano e cerca de 80% de todas as infecções microbianas em humanos podem estar relacionados à formação de biofilmes microbianos (RICHARDS et al, 2008).

Biofilmes são formados de células microbianas viáveis, juntamente com células mortas e uma vasta gama de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) de sua própria produção, incluindo polissacarídeos, ácidos nucléicos (DNA extracelular a partir de bactérias), e proteínas (AKBARI & KYLLERUP, 2015).

Sabe-se que a formação de biofilmes em dispositivos médicos leva a uma série problematização. Em um primeiro momento, os reservatórios de microrganismos formados sobre a superfície destes dispositivos podem conduzir a uma infecção crônica. Em um segundo momento, pode ocorrer resistência da comunidade de microrganismo ao tratamento convencional, e por fim, às respostas do hospedeiro. Aliado a isso, as terapias antimicrobianas são frequentemente incapazes de eliminar os microrganismos presentes nos biofilmes e uma resposta inflamatória crônica local quase sempre é produzida em resposta ao biofilme formado (TURNER et al., 2009).

Entre os microrganismos envolvidos na formação de biofilmes em material médico hospitalar destaca-se a *Pseudomonas aeruginosa* e leveduras do gênero *Candida*. Tais agentes apresentam a capacidade de formar biofilme em diferentes superfícies e vêm demonstrando bastante resistência aos antimicrobianos e antifúngicos (WISPLINGHOFF et al., 2004; RAMAGE et al., 2006; YU et al., 2005; LAFLEUR et al., 2006; SENEVIRATNE et al., 2008).

Nas últimas décadas, a procura por novos medicamentos a base de plantas medicinais tem aumentado de forma significativa, com o objetivo de descobrir novos compostos com efeitos *in vitro* e *in vivo*. Muitas pesquisas já comprovaram que componentes de plantas apresentam atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante (VEIGA JUNIOR et al., 2007; BENMALEKE et al., 2013).

Devido a essas características neste estudo foram selecionados três diferentes óleos essenciais extraídos das seguintes plantas: *Cymbopogon martinii*, conhecido como óleo de palmarosa, *Eugenia caryophyllus* popularmente conhecido como óleo de cravo e *Thymus vulgaris* L., conhecido como óleo de tomilho.

O óleo essencial de palmarosa (OP) é rico em geraniol (70-90%) que é um monoterpenóide. Apresenta diferentes propriedades farmacológicas, dentre elas a eficácia contra insetos, ação antitumoral, anti-infecciosa, atividade imunomoduladora, além de antimicrobiana como, por exemplo, frente a *C. albicans* (ATCC 10231), *S. aureus*, *E. coli* e *S. Typhimurium* (VAN ZYL et al., 2006; DUARTE et al., 2007; JIROVETZ et al., 2007; SHERER et al., 2009; ALMEIDA et al., 2011).

O óleo essencial de cravo (OC) apresenta atividade antimicrobiana e antifúngica reconhecida, sendo que o eugenol, representa cerca de 77% da constituição total do óleo, sendo o principal responsável por sua atividade.

Ao óleo essencial de tomilho (OT) já foram atribuídas atividades antimicrobiana, carminativa e expectorante. Tais atividades estão relacionadas aos seus constituintes majoritários, timol e carvacrol.

Neste contexto, o objetivo do presente projeto será avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme dos óleos essenciais (OE) (palmarosa, tomilho e cravo) e seus constituintes majoritários (CM) (geraniol, timol e eugenol) frente a biofilme de *C. albicans* e de *P. aeruginosa* cepa PA01 formada em materiais médicos hospitalares.

2. METODOLOGIA

Os óleos essenciais de palmarosa, tomilho e cravo foram adquiridos comercialmente da empresa Ferquima Indústria e Comércio de óleos essenciais (Vargem Grande Paulista-SP). Os constituintes majoritários geraniol, timol e eugenol foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (Brasil). Os materiais médico hospitalares foram adquiridos de empresas especializadas do ramo médico.

A caracterização dos óleos essenciais foi realizada na Universidade Federal de Pelotas (UFPel), no curso de Química. Após preparação dos óleos essenciais os mesmos foram submetidos à análise por CG e CG-MS.

Os microorganismos foram mantidos em meio de cultura com glicerol e congelados a -80°C, posteriormente inoculados em caldo (BHI) e, por conseguinte incubados por 24 horas a fim de serem semeados em ágar Sabouraud para o fungo e ágar BHI para a bactéria. Os mesmos foram incubados por 24 horas à 37°C até a realização os experimentos.

A concentração inibitória mínima (CIM), a concentração fúngica mínima (CFM) e a concentração bactericida mínima (CBM) foram avaliadas pelo método de microdiluição em placa utilizando uma cepa de *C. albicans* (ATCC 14053) e *P. Aeruginosa* PA01, respectivamente.

A formação do biofilme nos materiais médico hospitalares ocorreu de acordo com as condições previamente descritas por GIONCO et al. (2016) com modificações. A atividade antibiofilme após tratamento com OE e constituintes majoritários está ainda em fase de execução e os resultados dos ensaios com cristal violota serão incorporados ao estudo em breve.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os constituintes majoritários foram analisados por Cromatografia Gasosa (CG). Foram observados para o óleo de palmarosa os seguintes constituintes majoritários: geraniol (35,27%, nerol 13,09% e acetato de geranil 9,68%. Para o óleo de tomilho: timol 49,27%, p-cineno 20,18% e carvacrol 11,89%. Para o óleo de cravo: eugenol 86%, beta-cariofileno 10% e acetato eugenila 1%.

A atividade antioxidante dos óleos e constituintes majoritários pelo método do FRAP pode ser visualizada na **tabela 1**.

Tabela 1. Atividade antioxidante dos óleos e seus constituintes majoritários no ensaio FRAP.

Óleos e constituintes	FRAP ($\mu\text{mol/L}$)
Óleo Palmarosa	784 \pm 30
Óleo Tomilho	980 \pm 15
Óleo Cravo	1200 \pm 10
Eugenol	670 \pm 20
Timol	850 \pm 14
Geraniol	1060 \pm 9
Vitamina E	1680 \pm 8

A atividade antimicrobiana dos óleos e constituintes majoritários frente a *Candida albicans* e *Pseudomonas aeruginosa* PA01 foi avaliada pela concentração inibitória mínima. Os resultados da MIC, CBM e CFM estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (MIC), concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fúngicida mínima (CFM) dos óleos essenciais e constituintes majoritários.

Óleos e constituintes	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01		<i>Candida albicans</i>	
	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	CBM $\mu\text{g/mL}$	MIC $\mu\text{g/mL}$	CFM $\mu\text{g/mL}$
Óleo Palmarosa	6,25	6,25	3,125	3,125
Óleo Tomilho	1,06	1,06	3,125	3,125
Óleo Cravo	12,5	25	6,25	12,5
Geraniol	25	25	6,25	12,5
Timol	0,175	0,175	0,35	0,175
Eugenol	6,25	12,5	3,25	3,25

4. CONCLUSÕES

Com os resultados deste projeto pode-se verificar que os constituintes majoritários que foram observados estão de acordo com os propostos pela literatura. A atividade antioxidante dos óleos essenciais e constituintes majoritários determinados pelo ensaio FRAP obtiveram resultados semelhantes aos determinados para a vitamina E. E às atividades antimicrobianas frente à *Pseudomonas aeruginosa* PA01 pode-se evidenciar que o óleo de tomilho e seu constituinte majoritário, timol, apresentaram melhor atividade comparado aos outros óleos testados. Em relação à atividade antifúngica frente à *Candida albicans*, evidenciou-se uma atividade similar entre o óleo de tomilho e o óleo de palmarosa. Contudo, o constituinte majoritário timol apresentou maior atividade antifúngica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKBARI, F.; KJELLERUP, B.V. Elimination of bloodstream infections associated with *Candida albicans* biofilm in intravascular catheters. *Pathogens*, v.4, 457-469, 2015.

- ALMEIDA, L.; CALVALCANTI, Y.; VIANA, W.; LIMA, E. Screening da Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais sobre *Candida albicans*. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*. v. 14, n. 4, p. 51-56, 2011.
- BENMALEKE, Y.; YAHIA, O.A.; BELKEBIR, A.; FARDEAU, M.L. Anti-microbial and anti-oxidant activities of *Illicium verum*, *Crataegus oxyacantha* ssp *monogyna* and *Allium cepa* red and white varieties. *Landes Bioscience*, v. 4, n.4, p. 1-5, 2013.
- DUARTE, M.C.T. et al. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *Journal of Ethno pharmacology*. v. 111, p. 197-201, 2007.
- GONGO, JL, VAUCHER, RA, FAUSTO, VP, QUATRIN, PM, LOPES, LQ, SANTOS, RC, GÜNDL, A, GOMES, P, STEPPE, M. Anti-*Candida* activity assessment of *Pelargonium graveolens* oil free and nanoemulsion in biofilm formation in hospital medical supplies. *Microb Pathog*.100:170-178, 2016.
- GONGO, J.L, VAUCHER, R.A, SAGRILLO, M, SANTOS, R.C,V, DUARTE, M.M, RECH, V.C, SOARES, L.Q.L, BEATRIZ, I.C, TATSCH, E, MORESCO, R.N, GOMES, P, STEPPE, M. Anti-inflammatory effect of geranium nanoemulsion macrophages induced with soluble protein of *Candida albicans*. *Microb Pathog*. 2017 Jan 31. pii: S0882-4010(16)30621-0. doi: 10.1016/j.micpath.2017.01.056. [Epub ahead of print].
- JIROVETZ, L. et al. Purity, antimicrobial activities and olfactory evaluations of geraniol/nerol and various of their derivatives. *Journal of Essential Oil Research*. v. 19, n. 3, p. 288-91, 2007.
- LAFLEUR MD, KUMAMOTO CA, LEWIS K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother*. Nov; 50(11):3839-46, 2006.
- RAMAGE G, MARTÍNEZ JP, LÓPEZ-RIBOT JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res*. Nov; 6(7):979-86, 2006.
- RICHARDS, J.; REED, C.; MELANDER, C. Effects of N-pyrrole substitution on the antibiofilm activities of oroidin derivatives against *Acinetobacter baumannii*. *Journal Elsevier*, v.18, p. 4325-4327, 2008.
- SENEVIRATNE, C. J., JIN, L. J., SAMARANAYAKE, Y. H. & SAMARANAYAKE, L. P. Cell density and cell aging as factors modulating antifungal resistance of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 52, 3259–3266, 2008.
- SHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M.C.T.; GODOY, H.T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu. v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.
- TURNER, I. G. et al. Sterility and Infection. In: Narayan R, ed. *Biomedical Materials*. New York, NY: Sprin Scien, p. 239-258, 2009.
- VAN ZYL, R.L. et al. The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents. *Journal of Essential Oil Research*. v.18, p.129-33, 2006.
- VEIGA JÚNIOR, V.F.; MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C. Plantas medicinais: cura segura? *Quim Nova*, v.28, p.519-528, 2007.
- WISPLINGHOFF H, BISCHOFF T, TALLENT SM, SEIFERT H, WENZEL RP, EDMOND MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*.Aug 1;39(3):309-17, 2004.
- YU DT, PETERSON JF, SEGER DL, GERTH WC, BATES DW. Frequency of potential azole drug-drug interactions and consequences of potential fluconazole drug interactions. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. Nov;14(11):755-67, 2005.