

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE IMMORTELE (*Helichrysum gymnocephalum*)

ANDRESSA DE OLIVEIRA BLANKE¹; RAFAELY PICCIONI ROSADO²; MATHEUS PEREIRA DE ALBUQUERQUE²; MIKAELE VALÉRIO TAVARES²; RODRIGO DE ALMEIDA VAUCHER³; JANICE LUEHRING GIONGO⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – andressa-blanke@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – rafaelypiccioni@hotmail.com;
matheusalbuquerque813@gmail.com; mikaelevalerio14@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – rodvaucher@hotmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – Programa de pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção (PPGBBio)/Faculdade Anhanguera de Pelotas – janicegiongo@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Segundo a organização mundial da saúde a resistência antimicrobiana é uma das dez maiores ameaças a saúde pública global e estima-se que em até 2050, haverá a perda de 10 milhões de vidas em todo o mundo anualmente (ANVISA, 2023).

A resistência aos antimicrobianos tem sido um problema ao longo da história humana e continua a representar uma ameaça para as populações devido a tratamentos repetidos, uso inadequado de medicamentos, cirurgia e/ou sistemas imunitários enfraquecidos, não só colocando a saúde humana em risco, mas também aumentando o custo do tratamento (COMMISSION, 2011). À medida que os microrganismos desenvolvem resistência aos medicamentos utilizados no tratamento, estes medicamentos por vezes tornam-se inviáveis e o agente patogénico pode persistir no hospedeiro, aumentando os riscos para a saúde e a contaminação de terceiros (WHO, 2018).

A resistência a antimicrobianos hoje chega a níveis assustadores, como os 80% de resistência à oxacilina em cepas de *Staphylococcus aureus*, ou 50% de resistência a carbapenênicos em cepas de *Klebsiella pneumoniae* encontradas em alguns estudos (WHO, 2014). Além disso, a *Candida albicans* é a espécie de maior prevalência em infecções, representando mais de 80% dos isolados (POMARICO *et al.*, 2009).

Devido ao seu teor de compostos anti-infecciosos os óleos essenciais podem ser aplicados no combate contra as bactérias resistentes a fármacos e para a prevenção da formação de resistência de microrganismos patogénicos (BIGOS *et al.*, 2012). Muitos deles têm alta atividade contra as bactérias gram-positivas e gram-negativas, assim como contra vírus e fungos (REICHLING *et al.*, 2009). Os óleos oferecem a oportunidade não apenas de combater a infecção, mas também inibem o crescimento microbiano (SIENKIEWICZ *et al.*, 2014).

Diante disso, o estudo da atividade antimicrobiana desta espécie de óleo essencial torna-se interessante e a partir dos resultados, poderemos ter uma alternativa para infecções microbianas.

2. METODOLOGIA

2.1 Óleo de Immortelle

O óleo de Immortelle possui o nome científico de *Helichrysum gymnocephalum* e foi comprado na empresa Terra Flor Aromaterapia juntamente com seu laudo técnico, o qual fornece a análise do produto e seu controle de qualidade.

2.2 Análise cromatográfica do Óleo de Immortelle (*Helichrysum gymnocephalum*)

A caracterização do óleo de Immortelle foi realizada através de Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS) na Universidade Federal de Pelotas, pelo Laboratório de Lipidômica e Bio-orgânica - LLIPBIO.

2.3 Atividade antimicrobiana

Para a avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada a concentração inibitória mínima (CIM), a concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM) frente as cepas de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Staphylococcus aureus* (ATCC 0023) e *Candida albicans* (ATCC 14053) oriundas da bacterioteca do LAPEBBIOM (Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos).

A determinação da CIM foi realizada usando a técnica de microdiluição em placas de 96 poços, de acordo com o método M7-A6 e M44-A2 do CLSI respectivamente. O composto foi preparado em uma diluição de 1:2 em DMSO 50% em um tubo estéril e armazenado a 4°C para minimizar a volatilização. A partir do primeiro poço, seguiu-se a diluição em série até o décimo poço da placa. Após a microdiluição em série, 10µL do inóculo em escala de 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) foram adicionados a todos os poços e incubados por 24 horas a 37°C. Foram realizados um controle negativo contendo apenas o meio de cultura e um controle positivo para o crescimento microbiano contendo o meio de cultura e 10µL do inóculo. A CIM foi definida como a menor concentração do composto que inibiu o crescimento microbiano e foi observada pela turbidez do meio de cultura nos poços da placa. Foram realizados em duplicata e a CBM e a CFM foram determinadas após a semeadura de 1µL do conteúdo do poço correspondente CIM, o poço anterior e o posterior a este, em ágar Mueller Hinton e incubado por 24 horas a 37°C para posterior quantificação das colônias.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O óleo de Immortelle (*Helichrysum gymnocephalum*) foi submetido à análise de CG-MS. Seus principais constituintes químicos são mostrados na Figura 1.

Peak#	R.Time	Area%	Mark	Name
1	5.958	0.57		.alpha.-Thujene
2	6.126	3.48	V	1R-.alpha.-Pinene
3	7.147	1.55		Sabinene
4	7.223	3.04	V	beta.-Pinene
5	7.606	2.49		2,3-Dehydro-1,8-cineole
6	8.292	0.58		alpha.-Terpinene
7	8.533	2.91	V	p-Cymene
8	8.743	68.39	V	Cineole
9	9.478	2.13		.gamma.-Terpinene
10	10.315	0.55	MI	Isoterpinolene
11	10.651	1.10	MI	beta.-Linalool
12	12.573	1.73		delta.-Terpineol
13	12.861	5.72		Terpinen-4-ol
14	13.246	0.96	MI	alpha.-Terpinol
15	19.389	1.48		beta.-Caryophyllen
16	20.246	1.56		alpha.-Humulene
17	21.725	0.58		.gamma.-Cadinene
18	21.952	1.19	V	delta.-Cadinene
		100.00		

Figura 1. Constituintes químicos do óleo de Immortelle (*Helichrysum gymnocephalum*) utilizando CG-MS.

Os óleos essenciais constituem-se de compostos específicos encontrados em folhas, flores, sementes, caules e raízes. Misturas complexas de substâncias voláteis

(por exemplo, álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas, fenóis, etc.) são propriedades importantes, tendo atividade antibacteriana e antifúngica. São geralmente compostos lipofílicos e, portanto, são capazes de atravessar a parede celular e se acumular na membrana citoplasmática bacteriana, levando ao aumento da permeabilidade ao romper a estrutura das diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios (BAKKALI *et al.*, 2008). Portanto, o aumento da fluidez da membrana parece ser um dos principais efeitos antimicrobianos induzidos pelo tratamento com óleo essencial. Altas concentrações de óleos essenciais ou exposição prolongada podem causar maiores danos às membranas plasmáticas das células, levando à perda de macromoléculas como DNA e proteínas, fatores intimamente relacionados à morte celular (HAMMER; CARSON, 2011).

Nas tabelas 1 e 2 observa-se os valores obtidos na CIM com o óleo de Immortelle (*Helichrysum gymnocephalum*), frente a *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM)

Bactéria	Concentração	
	CIM (mg/ml)	CBM (mg/ml)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	28,6	28,6
<i>Staphylococcus aureus</i>	14,3	14,3

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração fungicida mínima (CFM)

Fungo	Concentração	
	CIM (mg/ml)	CFM (mg/ml)
<i>Candida albicans</i>	57,3	57,3

O óleo de Immortelle (*Helichrysum gymnocephalum*) possui como principal constituinte o cineol. Devido a esse componente, o óleo essencial tem um forte efeito antimicrobiano. Este fato é comprovado por Mulyaningsiha *et al.* (2010) onde eles testaram o cineol frente a microorganismos: gram-negativos (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii*), gram-positivos (*B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *Enterococcus faecalis*) e leveduras (*C. albicans* e *C. glabrata*) com CIM variando entre 8 e 64 mg/mL. Já Moo *et al.* (2021) avaliaram a atividade antibacteriana do cineol frente a *K. pneumoniae* e obtiveram CIM de 28,83 mg/mL.

Assim como, Caputo *et al.* (2017) e Mączka *et al.* (2021) que analisaram óleos essenciais que possuem cineol como constituinte químico em comparação com o composto químico cineol e comprovaram que nas concentrações inibitórias mínimas os óleos essenciais foram eficazes, frente as cepas estudadas.

Isso sustenta o fato de que o cineol pode ser o responsável pela atividade biológica do óleo de Immortelle (*Helichrysum gymnocephalum*).

4. CONCLUSÕES

Sendo assim, podemos concluir que o óleo de Immortelle (*Helichrysum gymnocephalum*) é um potente antimicrobiano e foi eficiente frente a *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, pois ficou evidenciado a atividade antimicrobiana mostrando-se promissor como alternativa terapêutica eficaz à resistência microbiana.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br>. Acesso em: 19 de agosto de 2023.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—A review. **Food and Chemical Toxicology**, 46:446–475, 2008.
- BIGOS, M.; WASIELA, M.; KALEMBA, D.; SIENKIEWICZ, M. Antimicrobial Activity of Geranium Oil against Clinical Strains of Staphylococcus aureus. **Molecules**, 17:10276-10291, 2012.
- CAPUTO, L.; NAZZARO, F.; SOUZA, L. F.; ALIBERTI, L.; DE MARTINO, L.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R.; DE FEO, V. Laurus nobilis: Composition of Essential Oil and Its Biological Activities. **Molecules**, 22(6):930, 2017.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2013.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M44-A2. Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2008.
- COMMISSION, EUROPEAN. Plano de ação contra a ameaça crescente da resistência antimicrobiana (2011). Brussels. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A52011DC0748>. Acesso em: 20 de agosto de 2023.
- HAMMER, K. A.; CARSON, C. F. Antibacterial and antifungal activities of essential oils. In: THORMAR, H. (Ed.). Lipids and essential oils as antimicrobial agents. **West Sussex: J. Wiley**, p. 255-306, 2011.
- MAÇZKA, W.; DUDA-MADEJ, A.; GÓRNY, A.; GRABARCZYK, M.; WIŃSKA, K. Can eucalyptol replace antibiotics?. **Molecules**, 26(16):4933, 2021.
- MOO, C. L.; OSMAN, M. A.; YANG, S. K.; YAP, W. S.; ISMAIL, S.; LIM, S. H.; CHONG, C. M.; LAI, K. S. Antimicrobial activity and mode of action of 1,8-cineol against carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae. **Scientific Reports**, 11(1):20824, 2021.
- MULYANINGSIHA, S.; SPORERA, F.; ZIMMERMANN, S.; REICHLING, J.; WINKA, M. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of Eucalyptus globulus against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. **Phytomedicine**, v. 17, p. 1061-1066, 2010.
- POMARICO L.; CERQUEIRA D.F.; SOARES R.M.A.; SOUZA I.P.R.; CASTRO G.F.B.A.; SOCRANSKY S.; et al. Associations among the use of highly active antiretroviral therapy, oral candidiasis, oral *Candida* species and salivary immunoglobulin A in HIV – infected children. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v.108 n.2 p.203-10, 2009.
- REICHLING, J.; SCHNITZLER, P.; SUSCHKE, U.; SALLER, R. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral and cytotoxic properties—An overview. **Forsch Komplementent.** 16:79–90, 2009.
- SIENKIEWICZ, M.; GŁOWACKA, A.; KOWALCZYK, E.; WIKTOROWSKA-OWCZAREK, A.; JÓŹWIAK-BEBENISTA, M.; ŁYSAKOWSKA, M. The Biological Activities of Cinnamon, Geranium and Lavender Essential Oils. **Molecules**, 19:20929-20940, 2014.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Antimicrobial resistance global report on surveillance: 2014 summary, 2014.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial resistance. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acesso em: 19 de agosto 2023.