

## **ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus aurantium* L. ssp. *Bergamia* ASSOCIADO A ANTIBIÓTICOS**

Victória Mello Avelar Costa<sup>1</sup>; Paula Sena da Mata<sup>2</sup>; Kátia Cristina Ugolini Mugnol<sup>3</sup>

1. Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: vicmello21@outlook.com
2. Mestranda em Biotecnologia; e-mail: psmata@outlook.com.br
3. Professor da Universidade Mogi das Cruzes; e-mail: katiac@umc.br

Área do Conhecimento: **Bioquímica.**

**Palavras-chave:** Óleo essencial; atividade antimicrobiana; antibióticos.

### **INTRODUÇÃO**

Os óleos essenciais são substâncias complexas consideradas metabólitos secundários das plantas e encontrados em seus diferentes órgãos. Sua principal característica é a volatilidade e são substâncias solúveis em solventes apolares. Aão geralmente incolores ou ligeiramente amarelados e não são estáveis na presença de ar, luz, calor e umidade. O método de arraste por vapor d'água emprega o sistema Clevenger, e é utilizado para extrair óleos essenciais de plantas frescas. A análise e quantificação da composição de quase todos os óleos essenciais se utiliza de métodos cromatográficos padronizados (SIMÕES, *et. al.* 2002) sendo que, dentre os componentes daqueles derivados de frutas, o limoneno costuma ser o componente mais representativo. Os óleos essenciais apresentam propriedades antimicrobianas e, frente a isso, diversos estudos estão sendo desenvolvidos empregando-os isoladamente ou associados a antibióticos. Sales, *et. al.* (2014) em seu estudo associou o óleo essencial de *H. courbaril* (jatobá) com ciprofloxacina, oxacilina e cloranfenicol e o óleo apresentou efeito sinérgico a esses antibióticos. O uso indiscriminado de antibióticos vem provocando progressivamente a seleção de microrganismos cada vez mais resistentes e, diante disso, a associação dos óleos essenciais aos antibióticos seria uma importante ferramenta para potencializar os medicamentos já existentes e reduzir a resistência bacteriana.

### **OBJETIVOS**

Determinar o potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Citrus aurantium* L. ssp. *Bergamia* associado a antibióticos.

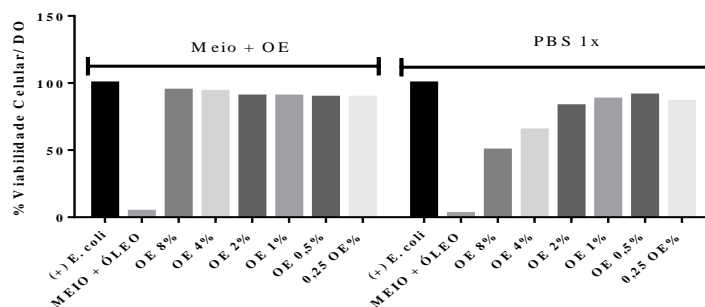
### **METODOLOGIA**

O óleo essencial foi extraído pelo método de Clevenger por arraste a vapor de água (SILVA, *et. al.*, 2010). Cascas trituradas de *Citrus aurantium* L. ssp. *Bergamia* foram colocadas em balão de fundo redondo contendo água destilada na proporção de 1:2. Este balão foi posicionado sobre uma manta térmica e acoplado ao sistema de condensação. Manteve-se a temperatura do sistema em 85°C por 1h30m. Ao término desse tempo, retirou-se o óleo essencial, separado da fase líquida condensada, e o acondicionou-se em frasco de vidro âmbar e posterior armazenamento a 4°C até o momento do uso. No teste de atividade antimicrobiana do óleo essencial em meio líquido preparou-se uma solução estoque do óleo essencial a 50% em etanol e, a partir dela, uma solução trabalho do óleo essencial a 8% em

meio líquido LB Broth. A partir desta, realizou-se diluição seriada, todas em LB Broth, nas seguintes concentrações: 4, 2, 1, 0,5 e 0,25%. Nos tubos com as diluições foram adicionados 100 µL de suspensão bacteriana de *Escherichia coli* (ATCC 25922) com densidade ótica de 1,0 em 625 nm que corresponde a  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL. Em seguida, os tubos foram incubados por 48h à 37°C. Após 24h e 48h, as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (Shimadzu®) a 625 nm. Após as leituras de 48h, as amostras foram centrifugadas por 15' em 1800 rpm, retirou-se o sobrenadante e o pellet formado foi ressuscitado em 1 mL de tampão PBS 1x e uma nova leitura foi feita no espectrofotômetro. As amostras foram centrifugadas novamente e ressuscitadas em 1 mL de meio LB Broth. Para confirmar os resultados obtidos nesse teste foram realizados testes de viabilidade celular por MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) e Alamar Blue® (resazurina). O teste de atividade antimicrobiana do óleo essencial associado a antibióticos em meio sólido utilizou o método do disco-difusão (OLIVEIRA, *et.al.*, 2006). Para este, nas placas foram semeados 50 µL de suspensão bacteriana de *Escherichia coli*. Sobre a semeadura posicionaram-se discos comerciais de antibióticos como placa controle e em outra placa, adicionaram-se 20 µL de óleo essencial a 1% diluído em etanol sobre os mesmos discos de antibióticos. Todas as placas foram incubadas por 48h a 37°C. Após 24h e 48h, os halos de inibição foram mensurados com régua calibrada. O teste de potencial antimicrobiano do óleo essencial utilizou o método de disco-difusão. Foi feita uma solução estoque de óleo essencial a 50% em etanol e desta realizou-se uma diluição seriada nas concentrações de 8, 4, 2, 1, 0,5 e 0,25%. Nas placas foram semeados 50 µL de suspensão bacteriana de *E.coli*. Em discos de papel filtro com Tween 20 a 0,1%, previamente autoclavados, acrescentaram-se 20 µL de cada concentração do óleo aos discos e os mesmos foram posicionados sob a placa. Todas as placas foram incubadas 37°C por 48h. Após 24h e 48h, os halos de inibição foram mensurados com régua calibrada. Utilizou-se a técnica de cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa para a caracterização da composição do óleo feita pela Central Analítica da Universidade de São Paulo.

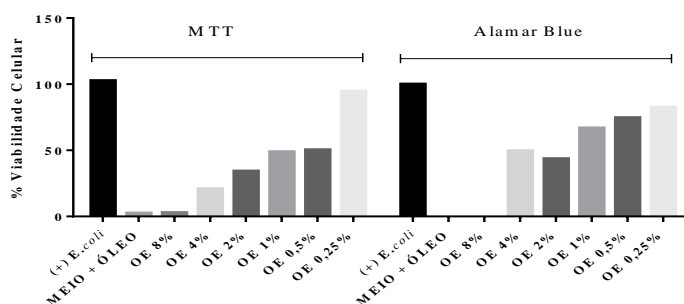
## RESULTADOS

A extração do óleo essencial pelo método de Clevenger foi efetiva e para cada 5 Kg de fruta fresca, o rendimento foi de aproximadamente 2 mL de óleo. Em sua caracterização o composto com maior percentual identificado foi o limoneno, correspondendo a 92,85% de sua composição. O teste em meio líquido demonstrou resultados eficazes, reduzindo consideravelmente a quantidade de bactérias na amostra (Figura 1). Apesar da discreta redução da viabilidade na presença do óleo, conforme mostrando na figura 1 (lado esquerdo) percebeu-se que o meio de cultura residual afetava a leitura de absorbância da amostra e, por isso, realizou-se o procedimento de centrifugação das amostras após 48h de incubação e sua ressuspensão em tampão PBS 1x para minimizar interferências do meio de cultura residual na leitura, o que provocava aumento da turvação. A aplicação desta técnica mostrou considerável redução da interferência do meio residual, favorecendo a visualização do efeito positivo do óleo essencial sobre as bactérias (redução da viabilidade), pois se percebe que o óleo essencial teve efeito inibitório sobre as bactérias uma vez que a viabilidade celular na presença do óleo a 8% caiu aproximadamente 50% em relação ao controle de 100% de viabilidade (cultivo sem óleo) e cresceu gradativamente em relação a esta amostra quanto menor a concentração de óleo utilizada. O efeito obtido foi dose dependente (redução da viabilidade proporcional ao aumento da concentração de óleo adicionado).



**Figura 1.** Valores da absorbância obtidos na presença do meio líquido + óleo essencial (à esquerda) e após centrifugação das amostras e sua posterior ressuspensão em PBS (à direita).

O ensaio de MTT é uma ferramenta útil na estimativa da atividade metabólica de células vivas, mas seu uso é exclusivo para células de eucariontes, não havendo descrição de seu uso para procariontes (como é o caso das bactérias). Porém, frente aos resultados apresentados na figura 1, buscou-se verificar se este teste poderia ser utilizado para verificar a redução de viabilidade microbiana na presença do óleo essencial. Realizou-se o teste de MTT na cultura de bactérias e constatamos que houve redução de MTT de modo proporcional à viabilidade microbiana na presença de diferentes concentrações do óleo essencial. Quanto maior a concentração de óleo, menor a viabilidade constatada pelo método tradicional (leitura de absorbância do cultivo, conforme Figura 1) e menor redução do MTT a formazan (conforme mostrado na Figura 2), de modo que os resultados foram coerentes entre si e demonstraram a possibilidade do uso do MTT neste tipo de teste. Paralelamente ao MTT, foi testado o protocolo com Alamar Blue® para validá-lo. Os resultados deste teste (Figura 2) mostram que também por esta técnica se visualiza a redução da viabilidade microbiana de modo dose-dependente. Quanto maior a concentração do óleo essencial menor o grau de redução do Alamar, o que indica menor viabilidade celular.



**Figura 2.** Comparação dos resultados dos testes de viabilidade celular por MTT e Alamar Blue de *Escherichia coli* na presença de diferentes concentrações de óleo essencial.

Quando realizada a associação do óleo com os discos comerciais contendo os antibióticos testados, não foram observadas alterações no perfil de sensibilidade. No entanto, os resultados com os antibióticos ciprofloxacina e tetraciclina mostraram um aumento no halo de inibição, conforme mostrado na tabela 1. A ciprofloxacina é um antibiótico da classe das quinolonas (inibe a DNA girase bacteriana) e apresenta um radical que a torna mais lipofílica. O óleo essencial possui característica lipofílica e essa característica poderia ter potencializado a capacidade do antibiótico em questão, gerando um efeito sinérgico.

| Nome comercial | Antibiótico sem associação | Antibiótico + óleo essencial 1% (24h) | Antibiótico + óleo essencial 1% (48h) |
|----------------|----------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Penicilina     | -                          | -                                     | -                                     |
| Tetraciclina   | 18 mm                      | 20 mm                                 | 19 mm                                 |
| Tobramicina    | 21 mm                      | 21 mm                                 | 25 mm                                 |
| Ofloxacina     | 31 mm                      | 31 mm                                 | 31 mm                                 |
| Amicacina      | 28 mm                      | 27 mm                                 | 27 mm                                 |
| Ceftazidima    | 29 mm                      | 28 mm                                 | 28 mm                                 |
| Ampicilina     | 18 mm                      | 11 mm                                 | 11 mm                                 |
| Ciprofloxacina | 31 mm                      | 36 mm                                 | 36 mm                                 |

**Tabela 1.** Valores dos halos de inibição encontrados no teste de sensibilidade de *Escherichia coli* a antibióticos em associação com o óleo essencial de *Citrus aurantium* L. ssp. *Bergamia*, a 1% em etanol. Medições de 24 e 48 h.

No teste realizado visando determinar o potencial inibitório do óleo essencial sobre a cepa de *Escherichia coli* utilizando a metodologia de disco-difusão através dos discos de papel filtro, constatou-se que nenhum halo inibitório foi detectado. Marotta, *et. al* (2016) em seu estudo testou o óleo essencial de *Citrus aurantium* L. ssp. *Bergamia* em uma linhagem bacteriana gram positiva, enquanto a bactéria analisada neste estudo foi a *Escherichia coli*, microrganismo gram negativo, que apresenta espessa camada lipídica, o que pode representar um limitante adicional à ação do óleo essencial.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos até o presente momento mostraram que o óleo essencial de *Citrus aurantium* L. ssp. *Bergamia* possui potencial antimicrobiano sobre cepa de *Escherichia coli* quando empregado sozinho e, quando associado a antibióticos, potencializa de modo discreto a ação de alguns dos antibióticos testados. Novos testes devem ser realizados para determinar outros sistemas de combinação do óleo com antibióticos de uso regular no controle de infecção por *Escherichia coli*, a fim de reafirmar os presentes resultados. Paralelamente a estas conclusões, é importante ressaltar que, a partir dos testes realizados e resultados obtidos, constatamos a possibilidade de uso das técnicas de MTT e Alamar Blue para determinação da viabilidade celular bacteriana, o que pode representar um ganho em estudos deste tipo.

## REFERÊNCIAS

- MAROTTA, Stefania M, *et. al*. Evaluation of the antibacterial activity of bergamot essential oils on different *Listeria monocytogenes* strains. **Italian Journal of Food Safety** 2016; volume 5:6176
- OLIVEIRA, R. A. G.; *et. al*. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 77-82, Jan./Mar, 2006.
- SALES, G. W. P.; *et. al*. Efeito antimicrobiano e modulador do óleo essencial extraído da casca de frutos da *Hymenaea courbaril* L. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.35, n.4, p.709-715, 2014.
- SILVA, C. A.; *et. al*. **Caracterização química do óleo essencial da casca do citrus sinensis obtido por hidrodestilação em aparelho Clevenger**. Belém: UFPA, 2010.

SIMÕES, Cláudia Oliveira; et. al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. Da UFSC, 2002.