

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

Victória Mello Avelar Costa¹; Paula Sena da Mata²; Kátia Cristina Ugolini Mugnol³

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. São 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).

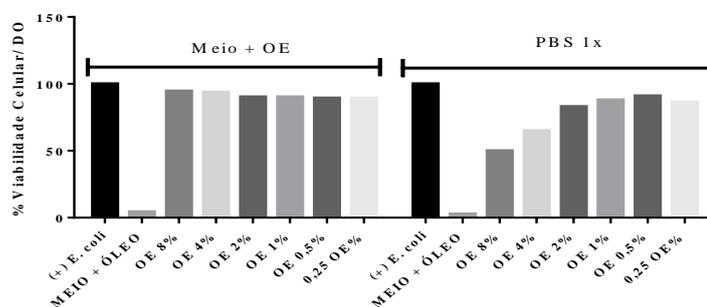


Figura 1. Valores da absorbância obtidos na presença do meio líquido + óleo essencial (à esquerda) e após centrifugação das amostras e sua posterior ressuspensão em PBS (à direita).

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.

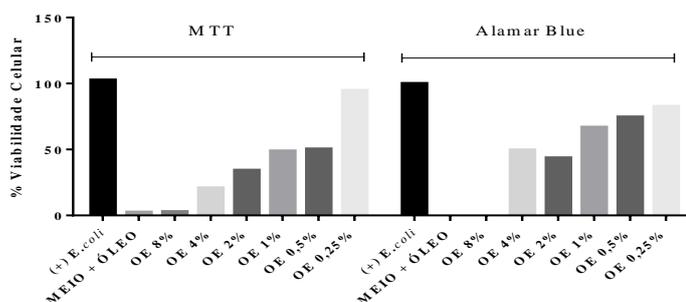


Figura 2. Comparação dos resultados dos testes de viabilidade celular por MTT e Alamar Blue de *Escherichia coli* na presença de diferentes concentrações de óleo essencial.

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.