

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 Mugnolo³

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

Área de Conhecimento: **Bioquímica.**

Palavras-chaves: Óleo essencial; atividade antimicrobiana; antibióticos.

INTRODUÇÃO

A busca por novos antibióticos é um desafio na atualidade, tanto devido à descoberta de novas moléculas eficientes quanto ao desenvolvimento de mecanismos de resistência inerentes aos próprios microrganismos. Substâncias naturais como os óleos essenciais têm sido alvo de alguns estudos nesse sentido, sendo o do presente trabalho a busca por forma de potencializar o efeito de medicamentos já existentes, mais especificamente antibióticos. Os óleos essenciais são substâncias complexas, consideradas metabólitos secundários de plantas e encontrados em diferentes partes de suas estruturas, sendo altamente hidrofóbicos, voláteis e instáveis quando expostos a luz. Um dos métodos para sua obtenção é o arraste por vapor d'água, via sistema Clevenger, ideal nos processos de extração de plantas e cascas de frutas cítricas. Sua composição possui moléculas da classe dos álcoois simples, fenóis e ácidos orgânicos, como fenilpropanóides e terpenóides. A determinação dos seus componentes geralmente se dá por métodos cromatográficos sendo que, em óleos derivados de frutas cítricas, o limoneno costuma ser o mais representativo. Há estudos que demonstram que vários tipos de óleos essenciais têm atividade antimicrobiana, isoladamente ou associados a outras substâncias. Sales, *et. al.* (2014), por exemplo, associou o óleo essencial de *H. courbaril* (jatobá) com ciprofloxacina, oxacilina e cloranfenicol e demonstrou que o óleo apresentou efeito sinérgico a esses antibióticos. Os mecanismos pelos quais esse sinergismo ocorre e a mensuração de fato dos efeitos dessas associações ainda não foi elucidado, justificando o presente trabalho, que busca demonstrar os efeitos sinérgicos entre o óleo essencial de *Citrus aurantium* L. ssp. *Bergamia* e antibióticos utilizados na prática clínica para tratamento de infecções diversas causadas por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, bem como empregar técnica de microscopia de força atômica visando promover conhecimento dos mecanismos envolvidos nesse processo.

OBJETIVOS

Determinar o potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Citrus aurantium* L. ssp. *Bergamia* associado a antibióticos. Verificar por microscopia de força atômica (AFM) o efeito do óleo isolado e em associação com antibióticos sobre a estrutura microbiana e formação de biofilmes.

METODOLOGIA

A extração do óleo essencial para desenvolvimento deste trabalho se deu pelo método de Clevenger (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, mantido a 85°C por 1h30min.. Durante o processo há separação do óleo essencial da fase

líquida condensada. Retirado dessa interface o óleo foi acondicionado em frasco de vidro âmbar e mantido a 4°C até o momento do uso. Para caracterização dos componentes do óleo essencial obtido foi realizada técnica de cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa pela Central Analítica da Universidade de São Paulo. 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, por diluição seriada, foram preparadas soluções de trabalho em LB Broth, em diferentes concentrações. Nos tubos com as diluições foram adicionados 40 µL de suspensão bacteriana de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), ambas com densidade ótica ajustada para 1,0 de absorvância em 625 nm, o que corresponde a $1,0 \times 10^6$ UFC/mL. As amostras foram incubadas por 24 horas à 37°C e depois submetidas a leitura de absorvância do *pellet* obtido por centrifugação e ressuspensão em 400 µL de solução fisiológica 0,9% estéril. Para o teste de atividade antimicrobiana do óleo essencial associado a antibióticos em meio sólido utilizou-se o método do disco-difusão (OLIVEIRA, *et al.*, 2006), no qual placas de LB Agar foram semeadas por esgotamento com suspensão de *E. coli*. Nas placas-teste foram posicionados discos comerciais com os antibióticos tetraciclina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), ácido nalidíxico (30 µg), ofloxacina (5 µg) e levofloxacina (5 µg), assim como discos previamente preparados por imersão de matrizes “virgens” em solução etanólica de óleo essencial em diferentes concentrações, e os mesmos discos comerciais de antibióticos associados ao óleo essencial (preparados por imersão dos discos na solução etanólica de óleo essencial a 1% por 10 minutos, seguido de secagem e aplicação nas placas). Todas as placas foram incubadas por 24 horas a 37°C e depois submetidas a medição dos halos de inibição com uso de régua calibrada. Para o teste de potencial antimicrobiano da ciprofloxacina isolada e associada a óleo essencial, em meio líquido, foram preparadas diluições seriadas do antibiótico em água destilada. A cada preparação foram adicionados os mesmos 40 µL de cada suspensão bacteriana, como no teste de avaliação do potencial antimicrobiano do óleo isolado, descrito acima, e realizados os mesmos procedimentos de incubação e leitura de absorvância por espectrofotometria. Para obtenção das imagens por microscopia de força atômica, foi utilizado o equipamento SPM 9600 (Shimadzu Corp.), sendo que as amostras foram analisadas utilizando *scanner* de 125 nm no modo contato, em temperatura ambiente (20°C) e pressão atmosférica (760 mmHg). Foi usada sonda triangular de silicone (OMCL – TR800PSA-1, Olympus®) e frequência de ressonância do *cantilever* ajustado para amplitude de 210 a 230 kHz. Para confecção da placa de amostra, aproximadamente 10 µL de cada suspensão bacteriana (preparadas como nos testes de avaliação do potencial antimicrobiano descritos acima) foi depositado em placa de mica de aproximadamente 0,5 cm² de área, seguida de secagem em estufa a 37°C por 3 horas.

RESULTADOS

A extração do óleo essencial pelo método de arraste a vapor resultou em um rendimento máximo de 4 mL de óleo essencial para cada 112g de casca fresca de *Citrus aurantium* L. ssp. *Bergamia*. A análise cromatográfica demonstrou ser o limoneno o componente predominante no óleo extraído (92,85%). Visando testar o potencial do óleo essencial extraído da casca de *Citrus aurantium* L. ssp. *Bergamia* sobre o crescimento bacteriano, procedemos a mensurações da viabilidade celular de cepas de *E. coli* e *S. aureus* mantidas por 24 horas em contato com diferentes concentrações dessa substância, em meio líquido LB Broth. Os resultados demonstram que houve significativa redução da viabilidade para ambas as cepas (Figura 1A). No teste da associação dos antibióticos ao óleo essencial, realizado em meio sólido exclusivamente para a *E. coli* por esta ter sido mais sensível aos efeitos do óleo essencial, houve aumento do halo de inibição apenas para os antibióticos tetraciclina (de 18 para 20 mm) e ciprofloxacina (de 31 para 36 mm) quando associados ao óleo essencial. Por esse motivo, selecionou-se a ciprofloxacina para os testes de associação com o óleo essencial, realizados para as duas cepas bacterianas alvos do estudo. Nossos

resultados (figura 1B) mostraram que para *E. coli* há redução de viabilidade em mais de 50% em relação ao controle positivo até a menor concentração de ciprofloxacina testada (0,03125 µg/mL). Já para o *S. aureus* a redução de viabilidade é menor em todas as concentrações testadas, sendo que a redução da viabilidade foi menor do que 50% em relação ao controle positivo somente até a concentração de 0,25 µg/mL deste antibiótico. De acordo com Martins, S. (2014), os bacilos gram-negativos aeróbios como os da família *Enterobacteriaceae* (da qual participa a *E. coli*) são os organismos mais suscetíveis à ciprofloxacina, o que corrobora os resultados que obtivemos. Visando agora determinar se a associação do óleo com a ciprofloxacina resulta de fato em potencialização do efeito desse antibiótico, que é o que vimos no teste em meio sólido, selecionamos a concentração de ciprofloxacina a 0,25 µg/mL para associação a solução etanólica do óleo essencial a 1%. A seleção dessa concentração de antibiótico se justifica por ser a menor que ainda proporcionou redução de viabilidade celular em mais de 50% tanto para *E. coli* quanto para *S. aureus* (e que está abaixo do MIC), enquanto a concentração do óleo a 1% decorre do fato de que nesta este não apresentou redução significativa da viabilidade. Os resultados deste teste estão apresentados na Figura 2.

Figura 1 - Viabilidade celular microbiana frente ao óleo essencial de *Citrus aurantium* L. ssp. *Bergamia* (A) e à ciprofloxacina (B), ambos isoladamente.

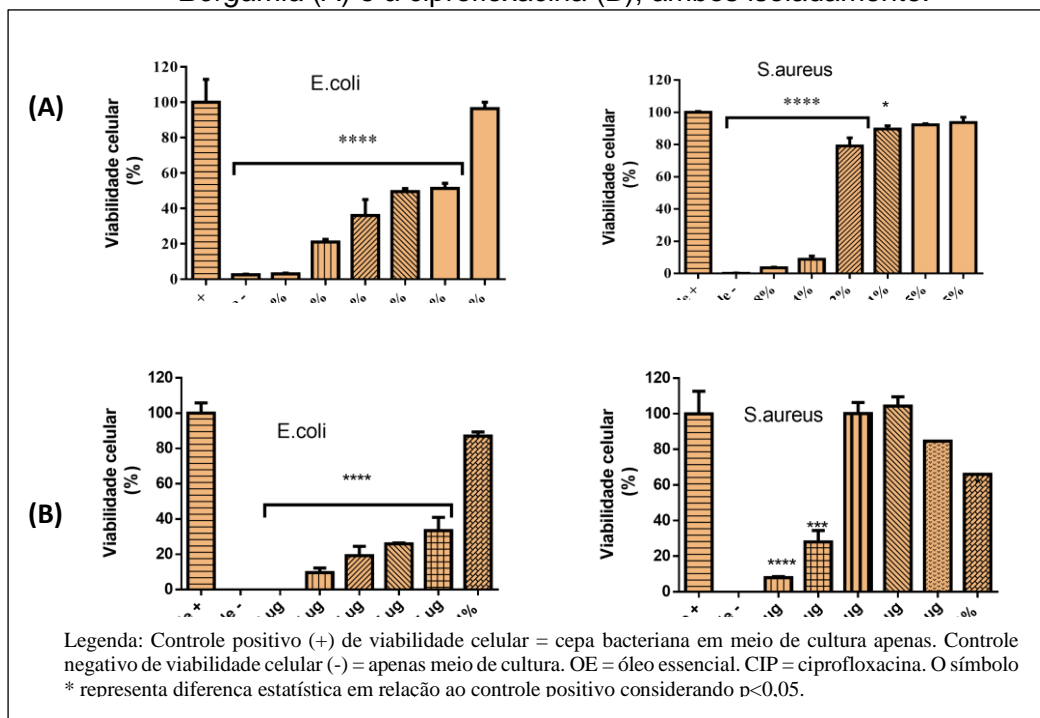
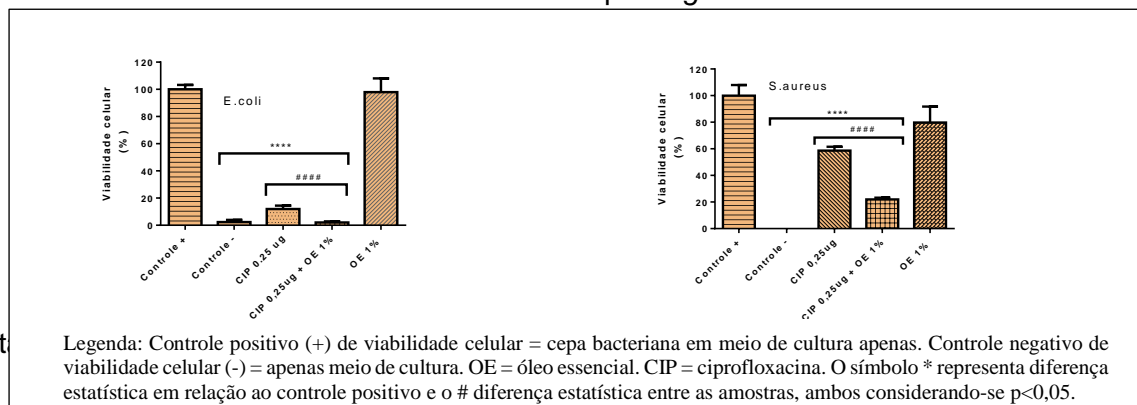
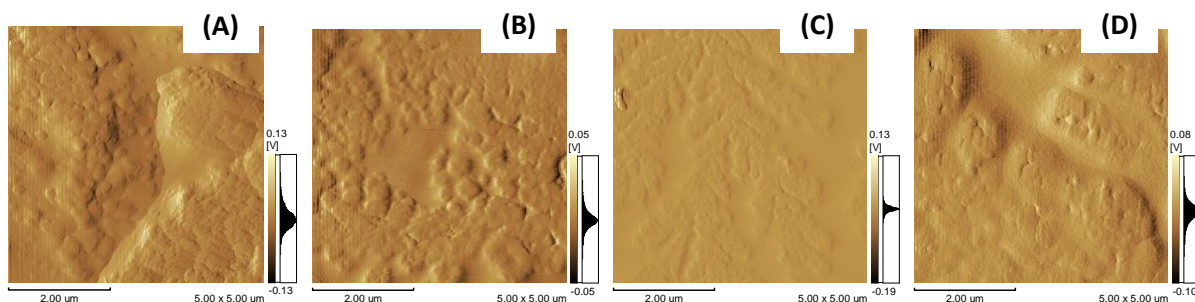


Figura 2 – Viabilidade celular microbiana frente à ciprofloxacina associada ao óleo de *Citrus aurantium* L. ssp. *Bergamia*.



E. coli quanto para *S. aureus*. Em *E. coli*, a viabilidade cai de 12% para 2% quando a ciprofloxacina é associada ao óleo. Em *S. aureus* a viabilidade vai de 58 para 21% quando dessa associação. Vale ressaltar que o óleo essencial na concentração a 1% não reduz a viabilidade celular de modo estatisticamente significativo, o que leva à hipótese de que a atividade antimicrobiana percebida quando da associação continua sendo decorrente da ação da ciprofloxacina. Deduz-se que o papel desempenhado pelo óleo essencial seja uma provável alteração da permeabilidade da parede celular, o que facilita a ação do antibiótico. Para buscar compreender os efeitos do óleo essencial e da ciprofloxacina isoladamente e em associação sobre a estrutura celular microbiana e sobre a organização dessas bactérias em filmes, procedemos à obtenção de imagens utilizando microscopia de força atômica (AFM). Algumas das imagens obtidas estão apresentadas na Figura 3. Na condição em que o filme é formado apenas pela suspensão de *E. coli* (figura 3A) notamos que a espessura média do filme é de 458,56 nm e distribuição bacteriana multicamada. Já na presença de ciprofloxacina 0,25 µg/mL, a espessura do filme cai para 194,16 nm (figura 3B) com distribuição bacteriana em monocamada (indica redução da população de bactérias). Na presença do óleo, tem-se que a espessura do filme é de 134,54 nm (figura 3C) e distribuição das bactérias em feixes organizados. Na presença de óleo essencial e ciprofloxacina a espessura do filme é de 334,94 nm (figura 3D) e a distribuição é ainda mais regular e em monocamada.

Figura 3 – Imagem por AFM de suspensão de *Escherichia coli* (A), na presença de ciprofloxacina 0,25 µg/mL (B), de solução etanólica de óleo essencial a 1% (C) e na associação de ambos (D).



CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostraram que o óleo essencial de *Citrus aurantium* L. ssp. *Bergamia* possui potencial antimicrobiano sobre cepa de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* quando usado isoladamente e em altas concentrações. Quando em baixa concentração e associado a ciprofloxacina aumenta significativamente o potencial antimicrobiano desta, tornando-se uma importante estratégia para redução da quantidade necessária deste antibiótico no combate eficiente de infecções bacterianas por *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Essa associação entre óleo essencial e ciprofloxacina resulta em alterações importantes tanto na redução da carga microbiana quanto na estruturação tridimensional dos biofilmes.

REFERÊNCIAS

- MARTIN, S. **Quinolonas em química medicinal**. Dissertação para obtenção do grau de mestre em ciências farmacêuticas. 2014. 74 f. Universidade do Algarve, Algarve, 2014.
- 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.

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.