

Avaliação da combinação de três óleos essenciais quanto à atividade antifúngica e antibacteriana sobre cepas patogênico-opportunistas

Evaluation of the combination of three essential oils for antifungal and antibacterial activity on pathogenic-opportunistic strains

RESUMO

Katleyn Rayana Pereira
katleyn@utfpr.alunos.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Cleverson Busso
cleversonbusso@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Na literatura científica muitos trabalhos demonstram efeitos antimicrobianos de óleos essenciais, porém, poucos avaliam o efeito da combinação destes compostos. Os óleos essenciais de Cedro da Virgínia, Lemongrass e Bergamot Italy são conhecidos por suas diversas propriedades benéficas ao homem. Neste sentido, este trabalho avaliou a atividade antifúngica e antibacteriana combinando os três óleos sobre as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens* e sobre as leveduras *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*. Células foram cultivadas em meio líquido, ajustadas e distribuídas em microplacas. Os óleos foram preparados individualmente e em combinação na proporção 1:1:1 e realizada uma diluição seriada em microplacas. A presença e ausência de crescimento microbiano foi comprovado pelo corante resazurina. O óleo essencial de cedro foi o mais efetivo contra as bactérias quando avaliado individualmente, porém, Lemongrass apresentou maior eficiência contra *P. Aeruginosa*. A combinação dos óleos intensificou o efeito antibacteriano especialmente contra *P. Aeruginosa*. Lemongrass também teve efeito inibidor contra *C. Glabrata*, sendo até mesmo mais efetivo que o Clotrimazol. A combinação dos óleos não potencializou o efeito contra as cepas de *Candida*. O uso combinado dos óleos essenciais pode ser efetivo, porém, é dependente de diferentes tipos de microrganismos o qual é aplicado.

PALAVRAS-CHAVE: Antimicrobianos. Concentração Inibitória Mínima. Compostos naturais.

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



ABSTRACT

In the scientific literature many works demonstrate antimicrobial effects of essential oils, but few evaluate the effect of the combination of these compounds. Virginia Cedar, Lemongrass and Bergamot Italy essential oils are known for their many beneficial properties to man. In this sense, this work evaluated the antifungal and antibacterial activity combining the three oils on the bacteria *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens* and yeast *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis*. Cells were cultured in liquid medium, adjusted and distributed in microplates. The oils were prepared individually and in combination at a 1: 1: 1 ratio and serial dilution in microplates. The presence and absence of microbial growth was confirmed by the resazurin dye. Cedar essential oil was the most effective against bacteria when evaluated individually, however, Lemongrass showed higher efficiency against *P.*

aeruginosa. The combination of the oils enhanced the antibacterial effect especially against *P. aeruginosa*. Lemongrass also had an inhibitory effect against *C. glabrata*, being even more effective than Clotrimazole. The combination of oils did not potentiate the effect against *Candida* strains. The combined use of essential oils can be effective, however, it is dependent on the different types of microorganisms to which it is applied.

KEYWORDS: Antimicrobials. Minimum Inhibitory Concentration. Natural Compounds .

INTRODUÇÃO

O Cedro da Virgínia (*Juniperus virginiana*) é uma árvore nativa da região leste da América do Norte, encontrada desde o sudeste do Canadá ao Golfo do México (ACHANA et al, 2009). O óleo essencial desta planta é um constituinte natural importante utilizado principalmente na composição de fragrâncias na indústria de cosméticos. Também é empregado para perfumar sabões e como um agente de imersão em lentes de microscopia. Estudos tem relacionado o uso do óleo essencial obtido desta planta com efeito contra fungos de podridão branca e marrom (CATLIN et al, 2016; TIANCHUAN et al, 2011).

O Bergamot Italy (*Citrus bergamia* Risso et Poiteau) é uma árvore de pequeno porte nativa da Itália e pertencente a família Rutaceae. Compostos obtidos a partir dos frutos desta planta apresentam inúmeras propriedades benéficas tais como atividade antioxidante, anti-inflamatória, antisséptica e atua na redução dos níveis de colesterol ruim no sangue (CALAPAI, 2012).

Já o Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) também conhecido como Capim Limão da Índia Oriental ou, simplesmente, capim limão é muito conhecido no Brasil como capim cidreira, erva-cidreira ou capim santo (no exterior é denominado de capim limão da Guatemala) (SILVA, 2013). No Brasil só existe o *C. citratus*, uma planta utilizada na medicina popular para o tratamento de resfriados, desintéria e antiespasmódico. Também há relatos da ação antimicrobiana obtida a partir do óleo essencial *C. citratus* (SANTOS, 2009). A diferença básica entre as duas plantas fica na composição química de seus óleos essenciais (NGUEFACK, 2004).

Embora haja alguns relatos da atividade antimicrobiana exercida por extratos e/ou óleos essenciais das plantas citadas acima, há uma necessidade de estudo do efeito dessas substâncias frente a bactérias de isolamentos clínicos, principalmente aquelas onde já é reportada a resistência contra antibióticos conhecidos. Diante disso, esse trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana individual e em combinação dos óleos essenciais das plantas mencionadas em bactérias e leveduras de isolados clínicos, ambientais e resistentes a antibióticos

METODOLOGIA

Linhagens: As cepas usadas neste experimento foram cedidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ. As cepas foram obtidas a partir de isolados

clínicos: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Clostridium perfringens* (ATCC 3624) e duas leveduras *Candida glabrata* (INCCQS 40136) e *Candida parapsilosis* (INCCQS 40038).

Obtenção dos óleos essenciais: Todos os óleos essenciais utilizados neste experimento foram obtidos da empresa Via Aroma Indústria de Aromatizantes de Ambientes LTDA, Porto Alegre, RS. Os produtos apresentam laudo de qualidade de pureza emitido pelo produtor.

Cedro da Virgínia: O óleo essencial foi obtido por processo de destilação da madeira da planta.

Bergamot Italy: O óleo essencial Bergamot Italy foi obtido através extração da parte externa da casca do fruto, pelo processo de prensagem a frio.

Lemongrass: Óleo essencial obtido a partir da grama em processo de destilação

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM): Os testes de CIM foram realizados segundo padronização estabelecida pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (NCCLS, 2003). A CIM é determinada como a menor concentração do óleo capaz de impedir o crescimento microbiano.

Os óleos essenciais utilizados neste estudo foram inicialmente diluídos conforme o método descrito por Aligiannis et al (2001). Para análise individual de cada óleo essencial foi adicionado em eppendorf estéril: 200 µL da substância testada, 800 µL de caldo Mueller Hinton (MH) e 2% de Tween 80 e homogeneizados em vortex. Para as leveduras foram utilizados o mesmo procedimento com exceção do meio de cultura, onde utilizou-se 800 µL do caldo **Brain Heart Infusion** (BHI). Para a determinação da CIM bacteriana, células viáveis foram semeadas em meio ágar MH 48h antes do experimento, e as leveduras foram semeadas em ágar BHI. Após 24h de crescimento, foi realizado um novo inóculo em caldo MH e o material transferido para a incubadora Shaker (150rpm) por 24h a 35°C. Para as leveduras o inóculo foi feito com caldo BHI e o material incubado a 150 rpm por 24h a 37°C.

A combinação dos óleos essenciais foi realizada seguindo o mesmo procedimento descrito acima, porém, os três óleos essenciais foram combinados na proporção de 1:1:1 com 2% de Tween 80 e então 200 µL da mistura foi adicionada em 800 µL de caldo MH e BHI (para bactérias e leveduras respectivamente).

As células utilizadas nos experimentos foram cultivadas previamente e ajustadas de acordo com escala 0,5 Mc Farland e distribuídas em microplacas de 96 poços, dispostos em 12 colunas (1 a 12) e 8 linhas (A a H). Cada uma dessas placas destinou-se a análise de dois microrganismos. As linhas G e H foram destinadas ao controle das mesmas. O primeiro poço iniciou-se com a concentração de 200 µL/mL do óleo essencial isolado e também da combinação dos três compostos. As placas contendo as bactérias foram incubadas a 35°C por 24 horas e posteriormente acrescentado em cada poço 20µL de uma solução aquosa Resazurina, e as microplacas incubadas novamente a 35°C por mais 2 horas. As placas com as leveduras foram incubadas a 37°C por 72h após foi

acrescentado em cada poço 20µL de Resazurina, as microplacas foram incubadas mais uma vez a 37°C por 5h. A leitura para a determinação da CIM do óleo testado foi realizada visualmente de acordo com Martins (2008), a cor azul nos indica que não há células viáveis, já a cor rosa indica a presença de células viáveis não inibidas pelo óleo essencial/combinaco dos leos

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na figura 1 estão representados os resultados e valores da Concentraco Inibitória Mínima (CIM) envolvendo a combinao dos três óleos essenciais contra as bactérias testadas. A correlaco entre o efeito individual de cada óleo e a combinao dos mesmos está descrita na tabela 1. Da mesma forma a eficiência de cada óleo pode ser comparada aos resultados obtidos na presença dos antibióticos gentamicina e ampicilina.

Figura 1. (A) Valores da CIM com a combinao dos três óleos essenciais para as bactérias *S. aureus* e *E. coli* e (B) *C. perfringens* e *P. aeruginosa*. O grupo controle corresponde ao caldo MH inoculado com as bactérias somente.

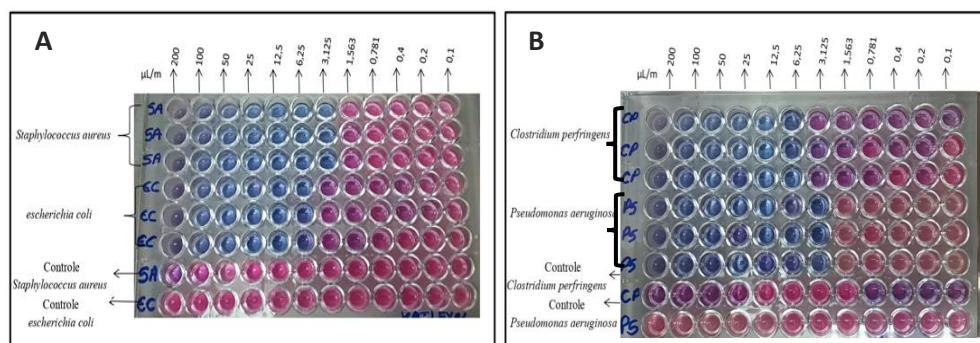


Tabela 1 – CIM de cada óleo essencial diante das bactérias avaliadas

Bactérias	CIM (µL/mL)				CIM (µg/mL)	
	<i>J. virginiana</i>	<i>C. bergamia</i>	<i>C. flexuosus</i>	Combinao dos três óleos essenciais	Gentamicina	Ampicilina
<i>E. coli</i>	0,2	9,3	1,5	6,2	0,19	3,12
<i>S. aureus</i>	0,4	37,5	3,1	3,1	0,09	0,09
<i>P. aeruginosa</i>	12,5	75,0	6,2	3,1	0,9	Resistente
<i>C. perfringens</i>	1,5	37,5	3,1	6,2	*	*

Fonte: Autoria própria (2019) e Cleverson Busso (2017) . (*) Não avaliado

A capacidade inibitória de cada óleo essencial e em combinao também foi avaliada diante de leveduras do gnero *Candida* conforme os resultados da tabela 2.

Tabela 2 – Valores da CIM de cada óleo essencial e em combinação diante das leveduras avaliadas.

Leveduras	CIM ($\mu\text{L/mL}$)				CIM ($\mu\text{g/mL}$)
	<i>J. virginiana</i>	<i>C. bergamia</i>	<i>C. flexuosus</i>	Combinação dos três óleos essenciais	Clotrimazol
<i>C. glabrata</i>	200	12,5	0,78	12,5	3,90
<i>C. parapsilosis</i>	200	25	1,56	6,25	0,24

Fonte: Autoria própria (2019) e Cleverson Busso (2017).

De todos os óleos essenciais avaliados isoladamente quanto a atividade antibacteriana, observou-se que o óleo essencial de Cedro da Virgínia foi o mais efetivo contra as bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *C. perfringens* com valores da CIM de 0,4, 0,2 e 1,5 $\mu\text{L/mL}$ respectivamente (Figura 1 e Tabela 1). A bactéria resistente a Ampicilina *P. aeruginosa* foi mais sensível ao óleo essencial de Lemongrass. Quando os óleos são combinados na proporção de 1:1:1 observou-se um efeito potencializado da combinação principalmente contra a bactéria resistente *P. aeruginosa*, com uma CIM de 3,1 $\mu\text{L/mL}$, ou seja, a combinação reduziu a concentração dos óleos quanto a atividade inibitória mínima (Tabela 1).

Nos testes com as leveduras *C. glabrata* e *C. parapsilosis* observou-se que o óleo essencial de Lemongrass teve maior atividade inibitória, sendo necessário apenas 0,78 $\mu\text{L/mL}$ para inibir *C. glabrata*, concentração inferior esta, inclusive, com aquela observada com o antifúngico clotrimazol (Tabela 2). A combinação dos óleos essenciais não potencializou, por exemplo, o efeito inibitório quando comparado com Lemongrass, sugerindo que este último responde melhor individualmente do que em combinação com os demais óleos essenciais.

A combinação de diferentes óleos essenciais pode otimizar ou reduzir a atividade inibitória bacteriana e fúngica, dependendo da cepa empregada no estudo. No entanto, o estudo da combinação com outros óleos essenciais é de extrema importância, uma vez que pode reduzir o custo daqueles que isoladamente teriam o mesmo efeito, porém, com valores elevados.

CONCLUSÕES

O óleo essencial de Cedro da Virgínia é o que apresenta maior eficiência antibacteriana quando testado isoladamente, já a combinação dos três óleos essenciais potencializa o efeito contra a bactéria *P. aeruginosa*, uma cepa resistente ao antibiótico ampicilina. O óleo essencial de Lemongrass foi o mais efetivo contra as cepas do gênero *Candida* avaliadas, porém, quando combinado com os demais óleos, não apresentou uma melhora dos resultados. O uso combinado dos óleos essenciais pode ser efetivo, porém, é dependente de diferentes tipos de microrganismos o qual é aplicado.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Cleverson Busso, pelo empenho dedicado à orientação deste trabalho. A Universidade Tecnológica Federal do Paraná, em especial ao Campus Toledo pela disponibilização do espaço físico laboratorial para que este trabalho pudesse ser desenvolvido. E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte deste trabalho.

REFERÊNCIAS

ACHANA, G. J.; CHARLES, C. L.; VALTCHO, Z. D. Dual extraction of essential oil and podophyllotoxin from *Juniperus virginiana*. **Industrial Crops and Products**. V. 30(2), p. 276-280, 2009.

ALIGIANNIS, N. et al. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two Origanum Species. **J Agric Food Chem**. V.49(9), p.4168-70, 2001.

CALAPAI G. Assessment report on *Citrus bergamia* Risso et Poiteau, aetheroleum, **EUROPEN MEDICINES AGENCY**. Londres, p.5-9/23, 2012,

CATLIN, N.R; HERBERT, R.; JANARDHAN K, et al. Dose-response assessment of the dermal toxicity of Virginia cedarwood oil in F344/N rats and B6C3F1/N mice. **Food Chem Toxicol.**;v.98, p.159–168, 2016.

MARTINS, M. E. **Aplicação de Bioensaios de toxicidade para avaliação da eficiência do reator anaeróbio horizontal de leito fixo (Rahlf) na detoxificação do aldicarbe**. Escola de engenharia de São Carlos. São Carlos,2008. p.15

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition**. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NGUEFACK, J.; BUDDE, B.B.; JAKOBSEN, M. Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. **Letters in Applied Microbiology**, v.39, n.5, p.395-400, 2004.

SANTOS, A. et al. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19, n. 2, p. 436-441, 2009.

SILVA, J. L. **Óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus*, *Vernonia polyanthes* e fosfito de potássio no controle da antracnose do feijoeiro**. 2013. 79 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

TIANCHUAN D.; TODD F. S.; CHUNG Y. H. Antifungal activities of three supercritical fluid extracted cedar oils. **Holzforschung**, v. 65, p. 277-284, 2011.