

Óleo essencial de *Styrax benzoin*: avaliação da atividade antibacteriana e antioxidante

RESUMO

Mariana Soares Rodrigues
Mariisoares25@yahoo.com.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

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

Devido às propriedades desinfectantes apontadas na literatura a partir da resina do benjoim, faz-se necessários maiores estudos sobre a atividade de seu óleo essencial frente a bactérias de isolados clínicos, principalmente aquelas onde já é reportada a resistência contra antibióticos conhecidos. Diante disso, esse trabalho avaliou a atividade antimicrobiana do óleo essencial de benjoim sobre bactérias de isolados clínicos, ambientais e resistentes a antibióticos. O óleo de benjoim foi obtido por hidrodestilação da goma da planta *Styrax benzoin*. As análises microbiológicas foram realizadas pela técnica de microdiluição em placa e a atividade antioxidante foi determinada através da capacidade sequestrante do radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e pelo método ABTS^{•+} [2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolona-6-ácido sulfônico)]. Os resultados demonstraram que o óleo essencial de Benjoim possui atividade antioxidante e também ação bactericida contra todas as cepas avaliadas, sendo que *S. aureus* apresentou maior sensibilidade, com uma CIM de apenas 0,78µL/mL e CBM de 1,56µL/mL. As bactérias *S. aureus*, *S. enterica* e *P. aeruginosa* apresentaram inibição com a concentração de 3,12µL/mL do óleo essencial e uma CBM com 6,25µL/mL, exceto *P. aeruginosa* onde foi observado efeito bactericida somente na concentração de 12,5µL/mL. Esta última bactéria apresenta resistência ao antibiótico ampicilina e só é sensível a gentamicina em concentrações superiores 0,39µg/mL. O fato do óleo essencial de Benjoim inibir o crescimento e apresentar atividade bactericida para as linhagens testadas constitui-se uma excelente alternativa para o controle de doenças desencadeadas por estas bactérias.

PALAVRAS-CHAVE: Antimicrobianos naturais. Concentração inibitória mínima. Concentração bactericida mínima.

1. INTRODUÇÃO

O benjoim (*Styraxbenzoin*) é uma árvore de grande porte nativa do sudeste da Ásia e integrante da família *Styracaceae* (FILIPPI et al., 2009). A resina de benjoim é empregada principalmente na indústria de aromas, mas foi amplamente empregada pelos romanos, egípcios e fenícios para tratamento de infecções crônicas do trato respiratório, devido principalmente por sua atividade desinfetante e expectorante (MODUGNO et al., 2006).

O bálsamo de benjoim do Sião (*S. tonkinensis* C.) e o bálsamo de benjoim de Sumatra (*S. paralleloneurum* P. e *S. benzoin* D.) são duas categorias comercialmente disponíveis, porém, apresentam constituições químicas distintas, o primeiro é constituído principalmente por coniferil, benzoato de coumaril e cinamato de cinamil. Já o segundo tem em sua composição grande quantidade de ácido cinâmico e derivados de cinamatos (HOVANEISSIAN et al., 2008).

Devido às propriedades desinfetantes apontadas na literatura a partir da resina do benjoim, faz-se necessários maiores estudos sobre a atividade de seu óleo essencial frente a bactérias de isolados clínicos, principalmente aquelas onde já é reportada a resistência contra antibióticos conhecidos. Diante disso, esse trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de benjoim sobre bactérias de isolados clínicos, ambientais e resistentes a antibióticos.

2. METODOLOGIA

2.1 LINHAGENS

As linhagens utilizadas neste experimento foram cedidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ. As linhagens foram obtidas a partir de isolados clínicos e do ambiente: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella enterica* (ATCC 13076) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442).

2.2 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* (CLSI M7-A6, 2003). A CIM é definida como a menor concentração do óleo capaz de impedir o crescimento microbiano. Já a CBM foi determinada com base na metodologia de Santurio et al. (2007) e indica qual a menor concentração que apresenta atividade bactericida.

Para a determinação da CIM, células viáveis foram semeadas em meio Ágar Mueller Hinton (MH) 48h antes do experimento. Após 24h de crescimento, foi realizado um novo inóculo em caldo MH e o material incubado em agitador orbital por 16h a 35°C. Após o período de incubação, as células bacterianas foram ajustadas de acordo com a escala 0,5 Mc Farland em caldo MH e distribuídas em microplacas de 96 poços. Em seguida o óleo essencial de Benjoim foi homogenizado com 2% de Tween 80 e distribuído seguindo uma diluição seriada em 12 poços da microplaca.

O controle positivo foi estabelecido com o uso dos antibióticos ampicilina (0,1 mg/mL) e gentamicina (0,1 mg/mL) adicionando-se juntamente com o inóculo e o meio de cultura líquido MH e com sucessivas diluições. O controle de

crescimento foi determinado com o inoculo em caldo MH e também com o inoculo em caldo contendo 2% do emulsificante TWEEN 80. Já o controle de esterilidade foi determinado somente com o caldo MH e também com caldo contendo o agente emulsificante.

As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas e posteriormente acrescidos em cada poço 20µL de uma solução aquosa de cloreto de trifeniltetrazolio (TTC) a 0,5% e as microplacas incubadas novamente a 35°C por mais 3 horas. A leitura para a determinação da CIM do óleo testado foi realizada visualmente através da presença de um “botão” avermelhado no fundo da cavidade de cada poço, um indicativo de células viáveis não inibidas pelo óleo essencial.

Para a determinação da CBM, foi observado em qual poço não houve crescimento bacteriano visível no teste da CIM, e posteriormente foi retirada uma alíquota de 10µL e inoculada na superfície de Ágar PCA. As placas foram incubadas por 24 horas e a CBM foi definida como a menor concentração do extrato capaz de causar morte do inoculo em 99,9%.

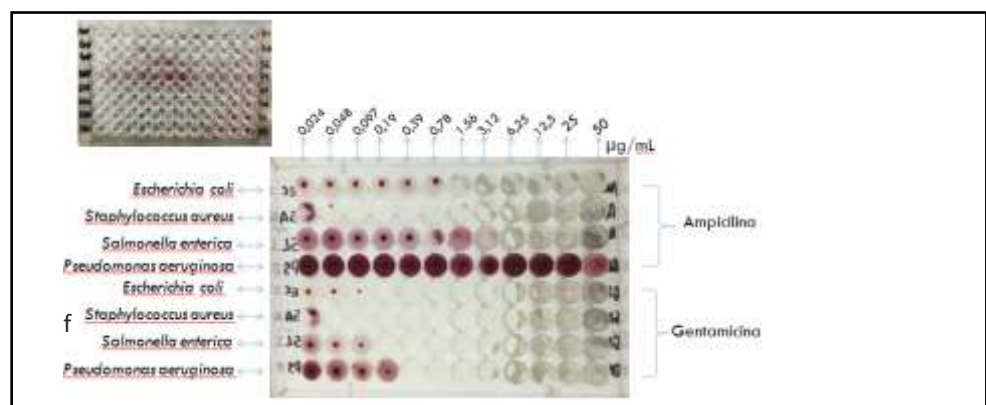
2.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE BENJOIM

A atividade sequestrante do radical DPPH* foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995) com modificações por Mensor et al. (2001), através da transferência de 500 µL de amostra, 3mL de etanol P.A e 300 µL de solução de DPPH (0,6 mM) e leitura em espectrofotômetro 517 nm após 30 minutos de reação. A atividade antioxidante pelo método ABTS** [2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)] foi realizada conforme metodologia descrita por Re et al. (1999) e Rufino et al. (2007), através da transferência de 30µL de amostra e 3mL da solução de ABTS (7mM), com radical formado pela reação com persulfato de potássio (140 mM) durante 16 horas e leitura a 734nm após 6 minutos de reação. Ambos os resultados foram expressos através da equação de reta da curva de trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico).

3. RESULTADOS

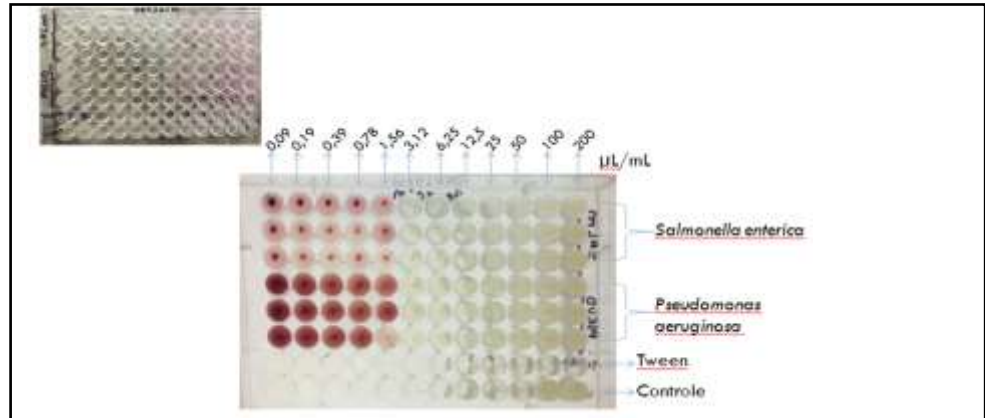
Na figura 1 é possível visualizar os resultados da CIM para os antibióticos utilizados como controle. Pontos vermelhos são indicativos de atividade redox bacteriana, ou seja, o metabolismo microbiano converteu o TTC em formazana indicando que as células ainda estão viáveis. Já as figuras 2 e 3 mostram os resultados da CIM das bactérias testadas.

Figura 1 – CIM dos antibióticos Ampicilina e Gentamicina, os valores de CIM correspondem àqueles últimos poços onde não há presença de formazana.



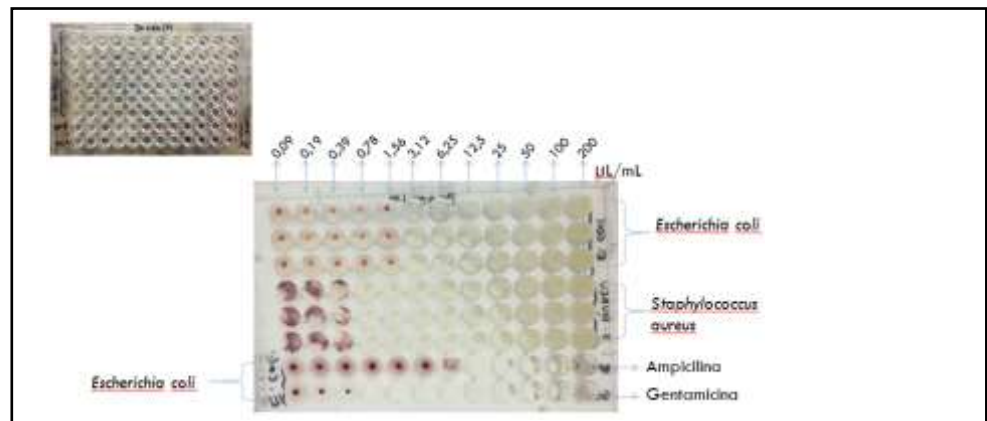
Fonte: Cleverson Busso (2017)

Figura 2 – CIM do óleo essencial de Benjoim sob as bactérias *Salmonella enterica* e *Pseudomonas aeruginosa*. O grupo controle corresponde ao caldo MH; óleo + caldo MH e também o Tween 80 + caldo MH.



Fonte: Autoria própria (2017)

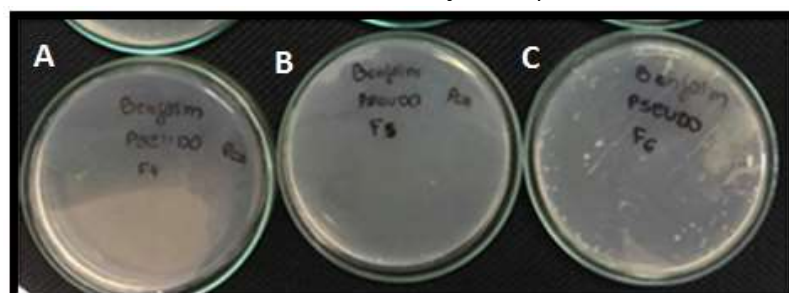
Figura 3 – CIM do óleo essencial de Benjoim sob as bactérias *E. coli* e *S. aureus*. Nesta placa também foram utilizados os antibióticos ampicilina e gentamicina como controle.



Fonte: Autoria própria (2017).

A figura 4 evidencia os resultados de CBM tendo a bactéria *P. aeruginosa* como exemplo. Observa-se a formação de colônias na concentração onde não há atividade bactericida do óleo essencial de benjoim.

Figura 4 - Placas de petri com meio Ágar PCA e a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) da bactéria *P. aeruginosa*. Aliquotas de 10µL dos poços da CIM (figura 2) foram semeadas em placas de Ágar PCA, as concentrações do óleo são: A) 25µL/mL; B) 12,5µL/mL; C) 6,25µL/mL. A CBM corresponde à placa onde 99% das bactérias estão mortas, nesse caso a concentração 6,25µL/mL.



A

atividade bacteriostática e bactericida foi avaliada conforme os dados da tabela 1 para o óleo essencial de benjoim e também para os controles utilizados como referência (ampicilina e gentamicina). Observa-se que para *P. aeruginosa*, o antibiótico ampicilina não teve efeito sobre a bactéria, constando desta forma a letra “R” de resistência.

Na tabela 2 estão os dados referente a atividade antioxidante exercida pelo óleo essencial de benjoim, de acordo com a metodologia DPPH e ABTS.

Tabela 1 - CIM e CBM dos antibióticos Ampicilina e Gentamicina e do óleo essencial de benjoim.

Bactérias	Óleo essencial de benjoim (µL/mL)		Antibióticos (µg/mL)			
	CIM	CBM	Ampicilina		gentamicina	
			CIM	CBM	CIM	CBM
<i>E. coli</i>	3,12	6,25	1,56	3,12	0,19	0,19
<i>S. aureus</i>	0,78	1,56	0,097	0,097	0,048	0,097
<i>P. aeruginosa</i>	3,12	12,5	R	R	0,39	0,39
<i>Salmonellaenterica</i>	3,12	6,25	6,25	12,5	0,19	0,19

Fonte: Cleverson Busso – Antibióticos (2017) e autoria própria – Benjoim (2017).

Tabela 2 – Atividade antioxidante do óleo essencial de Benjoim através do método da captura do DPPH[•] e do ABTS^{••}.

ÓleoEssencial	DPPH (µmol Trolox g ⁻¹)	ABTS (µmol TEAC g ⁻¹)
<i>Styrax benzoin</i>	95,30±8,19	198,81±24,66

Fonte: autoria própria (2017).

4. DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que o óleo essencial de Benjoim possui ação bactericida contra todas as cepas avaliadas, sendo que *S. aureus* apresentou maior sensibilidade, com uma CIM de apenas 0,78µL/mL e CBM de 1,56µL/mL. As bactérias *S. aureus*, *S. enterica* e *P. aeruginosa* apresentaram inibição com a concentração de 3,12µL/mL do óleo essencial e uma CBM com 6,25µL/mL, exceto *P. aeruginosa* onde foi observado efeito bactericida somente na concentração de 12,5µL/mL. Esta última bactéria apresenta resistência (R) ao antibiótico ampicilina e só é sensível a gentamicina em concentrações superiores 0,39µg/mL.

Estudos da atividade antioxidante de óleos essenciais de canela, limão, louro e citronela através da técnica ABTS, mostraram que estes óleos apresentam ação antioxidante em intervalos entre <0,1 até 3,16mmol TEAC g⁻¹ (BORGES et al., 2011) o que corrobora os resultados, sugerindo que o óleo essencial de benjoim teve atividade antioxidante nas condições avaliadas.

5. CONCLUSÃO

O fato do óleo essencial de Benjoim inibir o crescimento das bactérias testadas e apresentar atividade bactericida constitui-se uma excelente alternativa para o controle de doenças desencadeadas por estas bactérias. Além disso, o efeito antioxidante demonstrado pelos dois testes neste trabalho, também mostram o potencial uso desta substância como inibidora da ação promovida por radicais livres.

Styrax benzoin essential oil: evaluation of antibacterial and antioxidant activity

ABSTRACT

Due to the disinfectant properties indicated in the literature from benzoin resin, further studies on the activity of its essential oil against bacteria of clinical isolates, especially those where resistance against known antibiotics is already reported. Therefore, this work evaluated the antimicrobial activity of benzoin essential oil on bacteria of clinical, environmental and antibiotic resistant isolates. Benzoin oil was obtained by hydrodistillation of the *Styrax benzoin* gum. The microbiological analyzes were performed by the plate microdilution technique and the antioxidant activity was determined by the sequestering capacity of the radical DPPH • (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and the ABTS • + [2,2-azino-bis - (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)]. The results showed that the essential oil of Benzoin has antioxidant activity and also a bactericidal action against all the strains evaluated, with *S. aureus* being more sensitive, with a MIC of only 0.78 $\mu\text{L} / \text{mL}$ and CBM of 1.56 $\mu\text{L} / \text{mL}$. The bacteria *S. aureus*, *S. enterica* and *P. aeruginosa* presented inhibition with the concentration of 3.12 $\mu\text{L} / \text{mL}$ of the essential oil and a CBM with 6.25 $\mu\text{L} / \text{mL}$, except *P. aeruginosa* where bactericidal effect was observed only in the concentration of 12.5 $\mu\text{L} / \text{mL}$. The latter bacterium shows resistance to the antibiotic ampicillin and is only sensitive to gentamicin in concentrations higher than 0.39 $\mu\text{g} / \text{mL}$. The fact that Benzoin essential oil inhibits growth and present bactericidal activity for the tested strains constitutes an excellent alternative for the control of diseases triggered by these bacteria.

KEYWORDS: Natural antimicrobials. Minimal inhibitory concentration. Minimal bactericidal concentration.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos enormemente ao professor Américo Wagner Junior e a técnica Maira Casagrande da UTFPR campus Dois Vizinhos, pelo auxílio técnico e fornecimento de reagentes para execução da atividade antioxidante deste trabalho. Também somos gratos Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) do Rio de Janeiro pelo fornecimento das linhagens bacterianas utilizadas neste estudo.

REFERÊNCIAS

BORGES, L. L.; LÚCIO, T. C.; GIL, E. S.; BARBOSA, E. F. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**. v.7, p.1-20, 2011.

FILIPPI, J.J et al. An unusual a cenaphthylenety pesesquiterpene hydrocarbon from Siam and Sumatra benzoingum. **Phytochemistry Letters**, v. 2, n. 4, p.216-219, nov. 2009.

HOVANEISSIAN, M. et al. Analytical investigation of styraxand benzoin balsams by HPLC- PAD-fluorimetryand GC-MS. **Phyto chemical Analysis**, v. 19, n. 4, p.301-310, jul. 2008.

MODUGNO, F.; RIBECHINI, E.; COLOMBINI, M. P. Aromatic resin characteris ation by gaschromatography–massspectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1134, n. 1-2, p.298-304, nov. 2006.

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.

RE, R; PELLEGRINI, N; PROTEGGENTE, A; PANNALA, A; YANG, M; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radicals Biologyand Medicinal**. v.26, n.9/10, p.1231-1237, 1999.

RUFINO, M. S. M; ALVES, R. E; BRITO, E. S; MORAIS, S. M; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia científica**: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS•+. Fortaleza, CE: Embrapa – Comunicado Técnico 128, 2007. 4p.

SANTURIO, J. M. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p.803-808, jun. 2007.

Recebido: 31 ago. 2017.

Aprovado: 02 out. 2017.

Como citar:

RODRIGUES, M. S.; BUSSO, C. Óleo essencial de Styraxbenzoin: avaliação da atividade antibacteriana e antioxidante. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UTFPR, 22., 2017, Londrina. **Anais eletrônicos...** Londrina: UTFPR, 2017. Disponível em: <<https://eventos.utfpr.edu.br/sicite/sicite2017/index>>. Acesso em: XXX.

Correspondência:

Mariana Soares Rodrigues

Rua do Comércio, 165, ap. 204, Bairro das Torres, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil.

Direito autoral:

Este resumos expandidos está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição-Não Comercial 4.0 Internacional.

