

Estudo da atividade antibacteriana e antioxidante do óleo essencial de *Ho Wood* (*Cinnamomum camphora*)

RESUMO

Eldrey Línicler da Silva dos Santos

eldreylinicler@hotmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Dois Vizinhos, Paraná, Brasil.

Cleverson Busso

cleversonbusso@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Dois Vizinhos, Paraná, Brasil.

Embora haja relatos da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. camphora*, há poucos estudos determinando as concentrações bactericidas deste composto em diferentes bactérias de interesse clínico e da área de alimentos. Desta forma, foi avaliado o efeito antimicrobiano desta substância em quatro linhagens bacterianas de origem clínica e ambiental. As análises microbiológicas foram realizadas pela técnica de microdiluição em placa. O óleo *Ho Wood* foi obtido por hidrodestilação da resina da planta *Cinnamomum camphora* e para avaliar a atividade antibacteriana desta substância foram testadas concentrações entre 200 e 0,08 µL/mL. A atividade antioxidante foi determinada através da capacidade sequestrante do radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Também foi avaliada a atividade antioxidante pelo método ABTS^{•+} [2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)]. De acordo com os resultados a bactéria *E. coli* apresentou uma maior sensibilidade ao óleo com CIM de 0,19 µL/mL e CBM de 0,39 µL/mL. Em seguida o crescimento de *S. enterica* foi inibido com uma concentração a partir 0,39 µL/mL e as células foram completamente mortas com 0,39 µL/mL do óleo. *S. aureus* apresentou uma CIM de 0,78 µL/mL e CBM de 3,12 µL/mL. A bactéria *P. aeruginosa* teve inibição de crescimento somente com 3,12 µL/mL do óleo, no entanto, a atividade bactericida só ocorreu com a concentração de 25 µL/mL demonstrando esta ser a bactéria mais resistente ao óleo essencial de *C. camphora*. Conclui-se que o óleo *Ho Wood* apresenta atividade antioxidante e antimicrobiana e que nas concentrações avaliadas foi efetiva na atividade inibitória/bactericida das bactérias testadas nesta técnica. Isto demonstra sua promissora utilização em áreas de controle bacteriológico, bem como um agente antioxidante.

PALAVRAS-CHAVE: Antimicrobianos naturais. Bactérias patogênicas. Radicais livres.

1. INTRODUÇÃO

Cinnamomum camphora (L.) Presl é uma árvore pertencente à família Lauracea e nativa do sul da China e também encontrada em Taiwan, sul do Japão, Coreia e Vietnam. Esta planta é popularmente conhecida como canforeira por ser fonte de obtenção da substância cetônica cânfora, utilizada principalmente em aroma terapia (GUO et al., 2016).

Quando o óleo essencial desta planta é obtido da madeira, este recebe o nome de *Ho Wood* e quando obtido das folhas é denominado de *Ho Leaf*. A grande presença de Linalol torna esta planta importante, pois substitui a extração desta substância a partir do Pau rosa (*Aniba rosaeodora*), planta esta que está em processo de extinção (MORAIS et al., 2009).

Extratos de várias espécies do gênero *Cinnamomum* mostraram efeitos promissores contra bactérias, fungos e insetos pragas (YANG et al., 2014). Além disso, há estudos que apontam a eficiência desses extratos no tratamento de doenças auto-imunes e até mesmo o câncer (LEACHET al., 2012; LIU et al., 2011).

Estudos apontaram que o óleo essencial dos frutos de *C.camphora* possui em sua composição D-cânfora, 1,8 cineol, linalol, α -terpineol e limoneno, sendo que a cânfora é o composto majoritário da planta (GUO, et al., 2016). Os compostos cineol e limoneno já são conhecidos na literatura por apresentarem atividade antibacteriana (HENDRY et al., 2009; CIMANGA et al., 2002).

Embora seja encontrados relatos da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. camphora*, há poucos estudos determinando as concentrações bactericidas deste composto em diferentes bactérias de interesse clínico e da área de alimentos. Desta forma, foi avaliado o efeito antimicrobiano desta substância em quatro linhagens bacterianas: *Escherichia coli* (isolado clínico), *Staphylococcus aureus* (isolado clínico), *Salmonella enterica* sub *sp* *enterica* serovar *Enteritidis* e *Pseudomonas aeruginosa* (água de biotério).

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 DETERMINAÇÕES 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 Mirra 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 inoculo 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 20 µL de uma solução aquosa de cloreto de trifenil-tetrazolio (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 10 µL 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 inóculo em 99,9%.

2.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL *HO WOOD*

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 30 µL de amostra e 3 mL da solução de ABTS (7mM), com radical formado pela reação com persulfato de potássio (140 mM) durante 16 horas e leitura a 734 nm 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

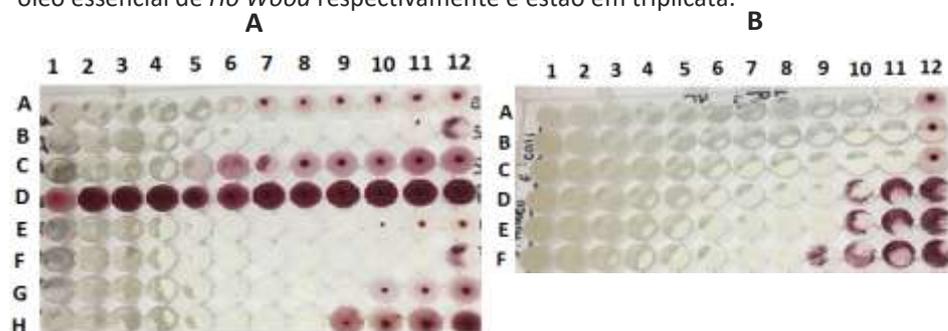
As concentrações inibitórias mínimas foram obtidas pela visualização do “botão” avermelhado em poços de microplacas (Figura 1A e 1B). A presença da cor avermelhada é resultante de atividade metabólica da célula pela conversão do TTC em formazana insolúvel, ou seja, é um indicativo que as células bacterianas estão viáveis e que o agente antimicrobiano não teve efeito nesta concentração avaliada.

ACIM é definida como a menor concentração do óleo capaz de impedir o crescimento microbiano, ou seja, o último poço que não apresenta a presença de formazana. Na figura 1A é possível observar as CIM para os antibióticos ampicilina e gentamicina para todas as bactérias testadas. Já na figura 1B estão

os valores de CIM para as bactérias *S. aureus* e *E. coli*. Os valores de CIM para todas as bactérias podem ser encontrados na tabela 1 e tabela 2.

A figura 2 mostra o resultado da CBM para o antibiótico ampicilina, alíquotas de poços adjacentes da CIM foram semeadas em placas de meio PCA, em seguida foi observado em qual placa houve efeito bactericida em 99% das células. Nesta figura observa-se que a placa de petri contendo alíquotas do poço C3 (figura 1A) foi a que teve a menor concentração onde matou 99% das bactérias.

Figura 1 -**(A)** Microplaca contendo as bactérias *E. coli* (linhas A e E); *S. aureus* (linhas B e F); *Salmonella* (linhas C e G) e *P. aeruginosa* (linhas D e H). Nas linhas de A – D foi utilizado o antibiótico ampicilina e nas linhas E – H o antibiótico gentamicina. Os valores das colunas (1 a 12) correspondem às concentrações de 50; 25; 12,5; 6,2; 3,1; 1,5; 0,7; 0,3; 0,19; 0,09; 0,04 e 0,02 µg/mL dos respectivos antibióticos. **(B)** CIM das bactérias *E. coli* (linhas A - C) e *S. aureus* (linhas D - F). As concentrações das colunas (do poço 1 ao 12) correspondem a 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39; 0,19; 0,09 µL/mL do óleo essencial de *Ho Wood* respectivamente e estão em triplicata.



Fonte: CleversonBusso – figura 1A (2017) e Autoria própria – figura 1B (2017).

Figura 2 -Placas de petri com meio Ágar PCA e a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM). C1 – C4 correspondem às concentrações de 50; 25; 12,5 e 6,2 µg/mL do antibiótico gentamicina.



Fonte: Autoria própria (2017).

Tabela 1 -CIM e CBM do óleo essencial de *Ho Wood*

Bactérias	<i>Ho Wood</i>	
	CIM (µl/mL)	CBM (µl/mL)
<i>E.coli</i>	0,19	0,39
<i>S.aureus</i>	0,78	3,12
<i>Pseudomonas</i>	3,12	25,0
<i>Salmonella</i>	0,39	0,39

Fonte: Autoria própria (2017)

Tabela 2 - Tabela 1. CIM e CBM dos antibióticos ampicilina e gentamicina

Bactérias	Antibióticos			
	Ampicilina ($\mu\text{g/mL}$)		Gentamicina ($\mu\text{g/mL}$)	
	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>E.coli</i>	3,12	12,5	0,19	0,78
<i>S.aureus</i>	0,097	0,39	0,097	0,39
<i>Pseudomonas</i>	Resistente	Resistente	0,39	1,56
<i>Salmonella</i>	12,5	50	0,19	0,78

Fonte: Cleverson Busso (2017).

Tabela 3 – Atividade antioxidante do óleo essencial de *Ho Wood* através do método da captura do DPPH* e do ABTS**

Óleo Essencial	DPPH ($\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$)	ABTS ($\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$)
<i>Cinnamomum camphora</i>	95,30 \pm 8,19	198,81 \pm 24,66

Fonte: autoria própria (2017).

4. DISCUSSÃO

De acordo com os resultados a bactéria *E. coli* apresentou uma maior sensibilidade ao óleo com CIM de 0,19 $\mu\text{L/mL}$ e CBM de 0,39 $\mu\text{L/mL}$. Em seguida o crescimento de *S. enterica* foi inibido com uma concentração a partir 0,39 $\mu\text{L/mL}$ e as células foram completamente mortas com 0,39 $\mu\text{L/mL}$ do óleo. *S. aureus* apresentou uma CIM de 0,78 $\mu\text{L/mL}$ e CBM de 3,12 $\mu\text{L/mL}$. A bactéria *P. aeruginosa* teve inibição de crescimento somente com 3,12 $\mu\text{L/mL}$ do óleo, no entanto, a atividade bactericida só ocorreu com a concentração de 25 $\mu\text{L/mL}$ demonstrando esta ser a bactéria mais resistente ao óleo essencial de *C. camphora*. Esta última bactéria mostrou-se ser resistente ao antibiótico ampicilina em todas as concentrações testadas.

Quando comparado com dados de Borges et al. (2011), verifica-se que o óleo essencial de *Ho wood* possui atividade antioxidante, uma vez que estes autores demonstraram a atividade antioxidante (ABTS) de óleos essenciais de variadas plantas (canela, limão, louro, citronela), cujo intervalo ficou entre <0,1 até 3,16 mmol TEAC g^{-1} .

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que o óleo *Ho Wood* apresenta atividade antimicrobiana e que nas concentrações avaliadas foi efetiva na atividade inibitória/bactericida das bactérias testadas nesta técnica. Além disso, a atividade antioxidante também foi observada no óleo essencial desta planta.

Study of antibacterial and antioxidant activity of *Ho Wood* essential oil (*Cinnamomum camphora*)

ABSTRACT

Although there are reports of the antimicrobial activity of the essential oil of *C. camphora*, there are few studies determining the bactericidal concentrations of this compound in different bacteria of clinical and food interest. In this way, the antimicrobial effect of this substance was evaluated in four bacterial lines of clinical and environmental origin. Microbiological analyzes were performed by plaque microdilution technique. The oil of *Ho Wood* was obtained by hydro distillation of the resin of the plant *Cinnamomum camphora* and to evaluate the antibacterial activity of this substance were tested concentrations between 200 and 0.08 $\mu\text{L}/\text{mL}$. The antioxidant activity was determined by the sequestering ability of the DPPH • (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical. The antioxidant activity was also evaluated by the ABTS • + [2,2-azino-bis- (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)] method. According to the results the *E. coli* bacterium showed a greater sensitivity to oil with MIC of 0.19 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and CBM of 0.39 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Then the growth of *S. enterica* was inhibited with a concentration of 0.39 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and the cells were completely killed with 0.39 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of the oil. *S. aureus* had a MIC of 0.78 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and MBC of 3.12 $\mu\text{L}/\text{mL}$. The bacterium *P. aeruginosa* had growth inhibition with only 3.12 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of the oil, however, the bactericidal activity occurred only at 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$, demonstrating that this bacterium is more resistant to the essential oil of *C. camphora*. It was concluded that *Ho Wood* oil showed antioxidant and antimicrobial activity and that in the evaluated concentrations was effective in the inhibitory / bactericidal activity of the bacteria tested in this technique. This demonstrates its promising use in areas of bacteriological control as well as an antioxidant.

KEYWORDS: Natural antimicrobials. Pathogenic Bacteria. Free radicals.

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.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Leben smittel Wissenschaft Und-technologie**. v.28, p.25-30, 1995.

CIMANGA, K et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 79, n. 2, p.213-220, fev. 2002.

GUO, S. et al. The Chemical Composition of Essential Oils from *Cinnamomum camphora* and Their Insecticidal Activity against the Stored Product Pests. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 17, n. 11, p.1836-1845, 4 nov. 2016.

HENDRY, E. R. et al. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine dig luconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 6, p.1219-1225, 16 out. 2009.

LEACH, M. J.; KUMAR, S. *Cinnamon* for diabetes mellitus. **Cochrane Database Of Systematic Reviews**, p.1033-1035, 12 set. 2012.

LI, X.W.; LI, J.; VAN DER WERFF, H. *Flora Reipublica e Popularis Sinicae*; Science Press: Beijing, China, 1982; Volume 7, pp. 102, 167, 175.

LIU, C et al. Sub a molide A, a component isolated from *Cinnamomum subavenium*, induces apoptosis mediated by mitochondria-dependent, p53 and ERK1/2 pathways in human urothelial carcinoma cell line NTUB1. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p.503-511, set. 2011.

MORAIS, J. W.; FIFUEIRA, J. A. M.; SAMPAIO, P.T. B. Eficiência de Inseticidas no Controle de Pragas em Sementes e Mudas de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), em Viveiros, Manaus, Amazonas. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 3, p.533-538, set. 2009.

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.

OMER, S.A.; ADAM, S.E.I.; MOHAMMED, O.B. Antimicrobial Activity of *Commiphora myrrha* Against Some Bacteria and *Candida albicans* Isolated from Gazelles at King Khalid

Wild life Research Centre. **Research Journal Of Medicinal Plant**, v. 5, n. 1, p.65-71, 1 jan. 2011.

PROVAN, G. J.; WATERMAN, P. G. Major triterpenes from the resins of *Commiphora incisa* and *C. kua* and their potential chemotaxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 27, n. 12, p.3841-3843, jan. 1988.

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 Biology and 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.

YANG, F al. Linalool, derived from *Cinnamomum camphora* (L.) Presl leaf extracts, possesses molluscicidal activity against *Oncomelania nosophora* and inhibits infection of *Schistosoma japonicum*. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p.407-420, 2014.

Recebido: 31 ago. 2017.

Aprovado: 02 out. 2017.

Como citar:

SANTOS, E. L. S.; BUSO, C. Estudo da atividade antibacteriana e antioxidante do óleo essencial de Ho Wood (*Cinnamomum camphora*). 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:

Eldrey Línicler da Silva dos Santos

Rua Ipiranga, número 246, apto 203, Bairro Centro, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil.

Direito autoral:

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

