

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA IN VITRO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus reticulata* NO CONTROLE DE *Enterococcus faecalis*¹

**Karine Raquel Uhdich Kleibert², Juliana Tünnermann³, Lenara Schalanski Krause⁴,
Simony Costa Beber⁵, Gabriela Matte Bertoldi⁶, Christiane de Fatima Colet⁷**

¹ projeto de pesquisa desenvolvido no grupo de pesquisa em uso de medicamentos e plantas medicinais (PLAMEDIC) da UNIJUÍ;

² Farmacêutica. Bolsista de mestrado PROSUC/CAPES do programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde. E-mail: karine.u.k@hotmail.com

³ Bacharel em Ciências Biológicas pela UNIJUÍ;

⁴ Farmacêutica. Bolsista de mestrado PROSUC/CAPES do programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde.

⁵ Farmacêutica. Mestranda no Programa de Pós-Graduação em Sistemas Ambientais e Sustentabilidade, Bolsista FAPERGS.

⁶ Farmacêutica. Mestranda no Programa de Pós-Graduação em Sistemas Ambientais e Sustentabilidade, Bolsista PROFAP/ UNIJUÍ;

⁷ Farmacêutica. Professora do programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde e Sistemas Ambientais e Sustentabilidade da UNIJUÍ;

INTRODUÇÃO

Os enterococcus são uma das principais causas de infecção multirresistente (GILMORE; LEBRETON; VAN SCHAİK, 2013). A espécie *Enterococcus faecalis* habita naturalmente o trato gastrointestinal de humanos (KLEIN, 2003), entretanto, esta pode se tornar patogênica, causando infecções nasocomiais, do trato urinário, endocardite, entre outras (AYOBAMI et al., 2020).

Os organismos resistentes e a falta de antibióticos são uma grande preocupação para a saúde pública, visto que podem ocasionar infecções clínicas de difícil controle (RODRIGUES et al., 2018). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), anualmente, 700 mil óbitos são ocasionados por bactérias resistentes no mundo. O Brasil contabiliza cerca de 20 mil mortes por ano por esta causa. E o uso desordenado de antibióticos é um dos fatores para esse cenário (TALAMONE; JUNIOR, 2021).

Considerando a resistência, acima abordada, tem se intensificado a busca pelo uso de insumos naturais, especialmente de origem vegetal, pela indústria farmacêutica (JOHANN, 2003). Nesse sentido, a atividade biológica e os efeitos fisiológicos gerados pelos metabólitos secundários das plantas despertam grande interesse (SILVA, et al., 2010). Dentre esses metabólitos, destaca-se os óleos essenciais, que apresentam diversas propriedades farmacológicas, entre elas antifúngicas, antibacteriana e antiviral (SIMÕES et al., 2017).

O presente trabalho está de acordo com os Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organizações das Nações Unidas, tendo em vista o objetivo 3 “Saúde e bem estar”, e 9 “Industrial, inovação e bem estar”(ONU, 2023). E, tendo em vista a potencial atividade biológica apresentada pelos metabólitos secundários das plantas da família Rutaceae (SILVA, 2006), o presente estudo tem por objetivo avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial de três espécies do gênero *C. reticulata* frente à *E. faecalis*.

METODOLOGIA

Trata-se de um estudo experimental *in vitro*, utilizando espécimes *Citrus reticulata* Blanco (bergamota) como matéria-prima vegetal. Foram utilizados como matéria-prima para a extração do óleo o epicarpo de frutos maduros *C. reticulata* coletados no município de Bozano/RS, localidade Boa Esperança, com localização geográfica: latitude -28.287399 e longitude - 53.759683. A espécime foi depositada no Herbário Rogerio Bueno da UNIJUI sob registro HUIRB n° 8206, respectivamente. A extração do óleo essencial ocorreu no Laboratório de Química Orgânica da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul - Unijuí, Campus de Ijuí/RS, através da técnica de arraste a vapor utilizando um aparelho tipo Clevenger modificado, conforme técnica descrita pela Farmacopéia Brasileira 6ª edição (ANVISA, 2019).

Em balança calibrada, foi realizada a pesagem do volume total de óleo essencial (OE) extraído. Para avaliação da densidade, foi realizada a pesagem de 1 ml de óleo essencial e, a partir desse resultado, calculou-se o volume total de OE extraído através da razão entre a massa e a densidade. Foi realizado cálculo para avaliação do rendimento da extração do óleo essencial. O teor de óleo essencial (TO) foi calculado em base úmida (BU) através da equação abaixo, onde V_o = volume de óleo extraído e B_m = biomassa vegetal utilizada (SANTOS et al., 2004):

$$TO = \frac{V_o}{B_m} \times 100$$

B_m

As soluções do óleo essencial foram preparadas a partir do óleo bruto diluído nas concentrações de 20%, 30%, 50%, 70% e 100% (volume/volume) em água estéril e Polisorbato 80 (tween 80) como agente emulsionante a 2%.

Para avaliação das propriedades antibacterianas do óleo essencial foi utilizada cepas da bactéria *E. faecalis* (ATCC 29212), sendo realizada a diluição em soro fisiológico estéril. A

padronização do inóculo foi realizada em espectrofotômetro UV –VIS, modelo IL- 592-LC-BI., com leitura a 625 nm, apresentando absorvância de 0,097.



Figura 1: Exsicata *C. reticulata*. Fonte: Autora (2022).

O preparo das placas foi realizado com o meio de cultura Muller Hinton e as mesmas foram semeadas sob a técnica de semeadura em swab. Após semeadas, as placas foram perfuradas para a formação de poços nos quais foram introduzidos 20 µL de cada uma das concentrações preparadas, foi utilizada uma placa para cada óleo essencial. Um dos poços foi utilizado como controle negativo sendo nele adicionado Polisorbato 80 (tween 80) e, para controle positivo, foram utilizados discos do antibiótico amoxicilina (ANVISA nº 80564740018). As placas foram levadas à estufa a 37°C e foi realizada a medição dos halos de inibição após 24 e 48 horas. Os testes foram realizados em triplicata para cada óleo.

A análise estatística foi conduzida através do software Estatística *Package for the Social Science* (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) versão 22.0. Foi utilizada estatística descritiva e analítica e, para a comparação das médias, foi utilizado o teste t de *Student* para amostras pareadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento da extração do óleo de *C. reticulata* foi de 0,359%, demais dados da extração estão apresentados na Quadro 1.

Quadro 1 – Caracterização da extração do óleo essencial de *C. Reticulata*.

	Massa de óleo obtida	Massa de cascas utilizada	Volume de óleo Obtido	Densidade do Óleo	Rendimento
<i>C. reticulata</i>	3,47 g	1084 g	3,90 ml	0,89 g/ml	0,359%

Fonte: Autora (2022).

No presente estudo, para o óleo essencial de *C. reticulata*, foi observada formação de halo de inibição a partir da concentração de 50%. Os resultados encontrados corroboram com Cavalcanti *et al.* (2012), para o qual é possível confirmar a atividade inibitória apenas para as concentrações de 70% e 100%, visto que, o valor médio do crescimento dos halos de inibição

ficou acima de 10 mm para ambas, o que não ocorreu para a concentração de 50%. Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Quanto à análise estatística, observou-se que a concentração de 50% do óleo essencial de *C. reticulata* apresentou uma menor inibição de *E. faecalis* em relação às concentrações de 70 e 100% e, também apresentou halo significativamente menor que o CP ($p=0,038$).

Tabela 1 – Diâmetro dos halos de inibição em mm observados nas placas de *E. faecalis* após 24 e 48 horas frente às diferentes concentrações de óleo essencial de *C. Reticulata*.

Diâmetro do halo de inibição – <i>C. reticulata</i>											
24 horas						48 horas					
Placa1	Placa2	Placa3	M	P1	Placa1	Placa2	Placa3	M	P2	P3	
20%	SI	SI	SI	-	-	SI	SI	SI	-	-	-
30%	SI	SI	SI	-	-	SI	SI	SI	-	-	-
50%	10	SI	SI	3,3	0,038*	5	SI	SI	1,6	0,047*	0,423
70%	10	10	20	13,3	0,184	16	10	16	14	0,368	0,840
100%	20	10	20	16,6	0,423	16	10	18	14,6	0,444	0,225
CP	20	20	20	20	-	14	20	20	18	-	0,423
CN	SI	SI	SI	-	-	SI	SI	SI	-	-	-

Legenda: SI: sem inibição; M: média; CP: controle positivo; CN: controle negativo; P1: concentrações x CP (24 horas); P2: concentrações x CP (28 horas); P3: 24 horas x 48 horas; *: $p > 0,05$ pelo Teste t de Student.

Fonte: Autora (2022).

C. reticulata apresenta uma concentração importante de flavonóides polimetoxilados em sua casca, lhe conferindo atividade antibacteriana (JOHANN,2003). Em estudo, Schmidt (2022) encontrou oito compostos no óleo essencial de *C. reticulata*, sendo o limoneno o composto em maior concentração (81,8%). De acordo com Goulart *et al.* (2018) o limoneno apresenta ação inibitória sobre bactérias do tipo *E. coli* e *S. aureus*, que está relacionado à alteração da permeabilidade e integridade da membrana celular bacteriana. Desse modo, a literatura corrobora com os resultados encontrados no presente estudo, que também identificou atividade antibacteriana para o óleo essencial de *C. reticulata*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O óleo essencial testado apresentou ação inibitória frente ao crescimento de *E. faecalis*. Os resultados apontam perspectivas para o uso dos óleos essenciais avaliados como fontes naturais de princípios ativos para o tratamento de infecções, os quais devem ser melhor avaliados quanto à segurança e seus efeitos *in vivo*.

Palavras-chave: Enterococcus. Plantas Medicinais. Resistência Microbiana a Medicamentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AYOBAMI, O. et al. The ongoing challenge of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in Europe: an epidemiological analysis of bloodstream infections. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 1180–1193, 1 jan. 2020.
- CAVALCANTI, Yuri Wanderley *et al.* Atividade antifúngica de extratos vegetais brasileiros sobre cepas de *Candida*. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, v. 16, n. 1, p. 43-48, 2012.
- DA SILVA, Cinara V. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Rutaceae do Nordeste Brasileiro. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, [s. l.], p. 355-360, 2010.
- DA SILVA, Cinara Vasconcelos. Alcalóides benzofenantridínicos e outros metabólitos do caule e frutos de *Zanthoxylum tingoassuiba* St. Hil. 2006. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal da Bahia, [s. l.], 2006.
- GILMORE, M. S.; LEBRETON, F.; VAN SCHAIK, W. Genomic Transition of *Enterococci* from Gut Commensals to Leading Causes of Multidrug-resistant Hospital Infection in the Antibiotic Era. **Current opinion in microbiology**, v. 16, n. 1, p. 10–16, fev. 2013.
- GOULART, Ana Luísa Ribeiro Martins *et al.* Atividade Antibacteriana do Óleo Essencial Extraído da Casca da Laranja Pêra Frente às Bactérias da Família Enterobacteriaceae. *Acta Biomedica Brasiliensia*, [s. l.], v. 9, n. 2, Agosto 2018.
- JOHANN, Susana. Atividade Antimicrobiana de Flavonóides Polimetoxilados Isolados de Frutos Cítricos. Orientador: Prof. Dr. Artur Smânia Júnior. 2003. 97 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
- KLEIN, G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. **International Journal of Food Microbiology**, Enterococci in Foods. Functional and Safety Aspects. v. 88, n. 2, p. 123–131, 1 dez. 2003.
- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **Objetivos de Desenvolvimento Sustentável**. Disponível em: <<https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>>. Acesso em: 10 ago. 2023.
- RODRIGUES, Tatyane Silva *et al.* Resistência Bacteriana a Antibióticos na Unidade de Terapia Intensiva: Revisão Integrativa. *Revista Prevenção de Infecção e Saúde*, [s. l.], v. 4, 2018.
- SANTOS, Alberdan Silva *et al.* Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório. Comunicado Técnico 99: EMBRAPA, Belém, PA, Novembro 2004.
- SCHMIDT, Jorge. Estudo da Composição Química e da Atividade Antimicrobiana dos Óleos Essenciais de *Citrus reticulata*, *Eugenia caryophyllata* e *Origanum vulgare*. Seminário científico do programa de pós graduação em promoção da saúde da UNISC, VII., 2022, UNISC. Anais, 2022.
- SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento**. Artmed, 2017.
- TALAMONE, Rose; JUNIOR, Ferraz. Morrem no mundo 700 mil pessoas por ano vítimas de bactérias resistentes. *Jornal da USP*, Ribeirão Preto, 19 nov. 2021. Disponível em: <https://jornal.usp.br/campus-ribeirao-preto/morrem-no-mundo-700-mil-pessoas-por-ano-vitimas-de-bacterias-resistentes/>. Acesso em: 10 jul. 2022.