

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus globulus* CONTRA PATÓGENOS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA

Max Sullivan Fontes¹, Nicolly Soares Ferreira², Mariana Drummond Costa
Ignacchiti¹, Juliana Alves Resende^{1,2}

¹Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Departamento de Farmácia e Nutrição/CCENS, Av. Alto Universitário, s/n, Guararema - 29.500-000 – Alegre – ES, Brasil, max.s.fontes@gmail.com, marianadci@gmail.com

²Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo- UFES, Alegre – ES, Brasil, ni.colly_ferreira@hotmail.com, juliana.resende@ufes.br

Resumo

O uso indiscriminado de antibióticos impulsiona a resistência bacteriana, tornando a pesquisa por novos fármacos uma necessidade urgente. As plantas medicinais oferecem um potencial promissor como fontes de drogas antimicrobianas. Neste estudo, foi investigado o potencial antibacteriano do óleo essencial (OE) de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) contra diferentes linhagens bacterianas. A concentração inibitória mínima (CIM) do OE sobre *Staphylococcus aureus* foi de 1,25%, 0,15% para *Enterococcus faecalis*, 5% para *Pseudomonas aeruginosa*, 1,25% para *Klebsiella pneumoniae* e superior a 10% sobre *Escherichia coli*. Esses resultados destacam o potencial do OE de eucalipto como uma fonte promissora de compostos antimicrobianos para o desenvolvimento de terapias eficazes contra infecções bacterianas.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana. Eucalipto. Concentração inibitória mínima.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas - Microbiologia

Introdução

Os avanços no descobrimento dos agentes antimicrobianos revolucionaram o tratamento médico, reduzindo drasticamente a mortalidade por doenças microbianas. No entanto, o uso indiscriminado de antibióticos tem levado ao aumentado preocupante da resistência microbiana (BRITO *et al.*, 2020). Recentemente, a organização mundial da saúde (OMS) inseriu a resistência antimicrobiana entre as dez ameaças à saúde global (WHO, 2020).

Essa resistência microbiana vem aumentando por vários fatores, tais como: incerteza no diagnóstico e prescrição inadequada de antibióticos, doses e/ou períodos de tratamento que não seguem a orientação médica, prática de automedicação, administração de medicamentos de indicação bacteriana para doenças virais, entre outros, eventos que tornam os medicamentos cada vez mais complexos (LOUREIRO *et al.*, 2016; TODESCATTO, *et al.*, 2022).

De acordo com a OMS, a resistência aos antibióticos está aumentando e se tornou, um problema de saúde global, que se não tratado, podem resultar em 10 milhões de óbitos no mundo em 2050. A ocorrência de infecções bacterianas têm sido cada vez mais frequentes, sendo responsáveis por aproximadamente 20% das mortes em todo o mundo (WHO, 2021).

Dentro do cenário de resistência microbiana alguns patógenos associados a infecções hospitalares se destacam, entre as cepas resistentes estão *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* produtoras de beta lactamases, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*. As infecções causadas por essas cepas têm alta letalidade e alto custo de tratamento (LISBOA, NAGEL, 2011; LOUREIRO *et al.*, 2016).

Diante desse cenário, a busca por novas fontes de antimicrobianos com toxicidade seletiva, com amplo espectro de ação e eficiência no combate ao crescimento microbiano tem se tornado essencial (SANTOS; PICCOLI; TEBALDI, 2017). O uso de fontes naturais, sustentáveis e menos tóxicas ao homem e ao meio ambiente, ganha destaque como uma alternativa promissora no tratamento de

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

infecções, substituindo os produtos sintéticos atualmente utilizados (SHARMA *et al.*, 2017). As plantas medicinais apresentam grande potencial para tal propósito pois atuam como fontes para o desenvolvimento de novas moléculas (semi-sintéticas) que possam auxiliar no controle de microrganismos de interesse médico.

Os óleos essenciais (OEs) são produtos naturais originados do metabolismo secundário das plantas. Eles são definidos como uma mistura complexa de compostos voláteis e com baixa massa molecular, sendo que os terpenos e terpenóides os principais componentes. Por serem lipofílicos, esses óleos geralmente se integram às estruturas da membrana, causando alterações na permeabilidade celular, inativação de componentes intracelulares e de enzimas (LIMA *et al.*, 2020). Em função de sua composição química são descritas propriedades antimicrobianas para os OEs (MOUTASSEM *et al.*, 2019).

O *Eucalyptus globulus* planta pertencente à família Myrtaceae, é conhecido por suas propriedades cicatrizante, anti-inflamatórias e antimicrobianas. Estudos recentes mostraram sua atividade antimicrobiana contra bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*. (MONTEIRO *et al.*, 2022)

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre o crescimento microbiano de bactérias Gram-negativas, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e Gram-positivas, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*.

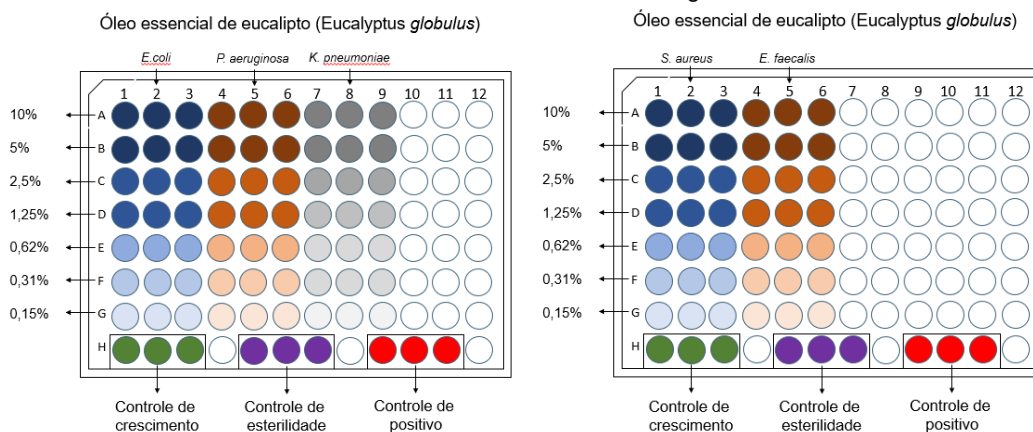
Metodologia

O óleo essencial (OE) de *Eucalyptus globulus* foi obtido comercialmente. Antes da realização dos experimentos o OE foi submetido à filtração para garantia de esterilidade.

Foram utilizadas linhagens controle de Gram-negativos, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603); e Gram-positivos, *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). As linhagens foram cultivadas em ágar Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas a $35 \pm 2^\circ \text{C}$ por 24h. Após esta última incubação as culturas foram submetidas à coloração diferencial de Gram para garantia da pureza.

A determinação da CIM do OE foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, segundo metodologia pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2019), com adaptações. Os ensaios foram realizados em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços, em triplicata. A mistura final de reação teve um volume de 200 μL , o meio de cultura utilizado foi Caldo Mueller Hinton (CMH) e a concentração final do inóculo no teste foi padronizada para 1×10^6 UFC/mL. As concentrações testadas do OE variando entre 0,15% a 10% (v/v). As soluções de OE foram acrescidas de 2,5% de DMSO para facilitar a solubilização do óleo em solução aquosa. Após a montagem, as microplacas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ \text{C}$ por 24h. Em seguida, foi realizada a inspeção visual do crescimento bacteriano (Figura 1).

Figura 1 - Desenho experimental do ensaio de microdiluição em placa para testagem da concentração inibitória mínima do óleo essencial frente as linhagens de interesse.



Fonte: Os autores

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

A CIM foi considerada a menor concentração de OE capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano, indicado pela ausência de precipitado ou turvação no meio de cultura após o período de incubação. Cada microplaca foi acompanhada de um controle de esterilidade (CE: meio de cultura), controle de crescimento (CC: inóculo + meio de cultura), controle positivo (CP: inóculo + meio de cultura acrescido de antimicrobiano padrão), todos submetidos às mesmas condições de cultivo visando garantir a validade dos resultados obtidos.

Após o teste de microdiluição foi feito o plaqueamento em ágar nutriente de cada um dos poços da CIM. As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ \text{C}$ por 18-24 horas. O resultado foi definido pela presença ou ausência da formação de colônias, sendo a ação classificada como bacteriostática ou bactericida, respectivamente.

Resultados

Atividade antimicrobiana do OE foi verificada através da determinação da concentração mínima inibitória (CIM). Foram testadas sete concentrações do OE que variaram de 0,15% a 10% v/v. Após a determinação da CIM, as linhagens bacterianas foram subcultivadas para verificação do tipo de ação inibitória exercida pelo OE. A CIM e a classificação da ação inibitória em bacteriostática e bactericida são mostradas na Tabela 1. Destaca-se que na maior concentração testada não foi observado inibição do crescimento de *E. coli*, portanto a CIM foi definida como $>10\%$.

Tabela 1 – Concentração inibitória mínima (CIM) e ação do OE de *Eucalyptus globulus*

Microrganismo	CIM (% e mg/mL)	Ação
<i>E.coli</i>	$>10\%$ ($> 100 \text{ mg/mL}$)	S/I
<i>P.aeruginosa</i>	5% (50 mg/mL)	Bacteriostática
<i>K. pneumoniae</i>	1,25% (12,5 mg/mL)	Bacteriostática
<i>E. faecalis</i>	0,15% (1,56 mg/mL)	Bacteriostática
<i>S. aureus</i>	1,25% (12,5 mg/mL)	Bacteriostática

S/I = sem inibição

Fonte: Os autores

Discussão

A microdiluição em caldo é uma metodologia que permite a determinação quantitativa da CIM, sendo possível avaliar diversas concentrações do óleo em microplaca, gerando uma economia de espaço, meios de cultura e reagentes (OSTROSKY *et al.*, 2008). A partir deste tipo de teste é possível evidenciar o efeito inibidor dos OEs e classificar a inibição do crescimento como ação bactericida ou bacteriostática (SILVA *et al.*, 2009).

As CIM encontradas para o OE tiveram efeito bacteriostático sobre todas as linhagens testadas (exceção de contra *E. coli*) (Tabela 1). Esta atividade bacteriostática indica uma inibição do crescimento bacteriano na presença do óleo mantendo a célula na fase estacionária (PANKEY; SABATH, 2013).

A partir da análise da microdiluição é possível verificar que os menores valores de CIM do OE foram frente as bactérias Gram-positivas (Tabela 1). Estudos sugerem que as bactérias Gram-positivas são mais suscetíveis aos OE, devido às diferenças na parede celular dessas bactérias. Gram-negativas possuem uma membrana externa rica em lipopolissacarídeo que impede a entrada dos compostos hidrofóbicos, evitando a ação do OE na célula bacteriana. Gram-positivas não têm essa barreira, permitindo que os componentes hidrofóbicos penetrem e causem as alterações na permeabilidade da membrana e extravasamento de constituintes intracelulares (CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017; RAPPER; VUUREN, 2020).

De acordo com Mulyaningsih *et al.* (2011) o óleo de *E. globulus* apresentou atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* resistentes a metilina com valores inferiores ao descrito no presente trabalho (0,25 mg/mL a 1 mg/mL). Neste mesmo estudo, a cepa de *E. faecalis* resistente à vancomicina foi inibida com concentrações de 0,5 mg/mL a 1 mg/mL. Para os autores, bactérias Gram-negativas como *E. coli* (ATCC 25922) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853), possuem uma bomba de efluxo de múltiplas drogas,

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

incluindo substâncias lipofílicas nocivas para células o que explicaria a não obtenção de resultados para tal bactéria no estudo.

Valor de CIM > 10% para o OE *E. globulus* foram relatadas para as linhagens *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* Mota *et al.* (2015). Cermelli *et al.* (2008), descreveram para o *E. globulus* a CIM > 4 mg/mL sobre *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* e *K. pneumoniae*. Os resultados do presente estudo corroboram os achados de Furtado *et al.* (2015) que não observaram inibição do crescimento sobre *E. coli* após o tratamento com o OE de *E. globulus* as concentrações 100%, 50% e 25%.

Por serem lipofílicos, esses óleos geralmente se integram às estruturas da membrana, causando alterações na permeabilidade celular, inativação de componentes intracelulares e de enzimas (AHMAD *et al.*, 2011; SERRA *et al.*, 2018).

O caráter hidrofóbico dos OE representa um ponto desfavorável na análise metodológica. Os métodos microdiluição em caldo foram desenvolvidos e otimizados para testes de susceptibilidade a antimicrobianos de natureza hidrofílica e os OE são misturas complexas de substâncias voláteis e lipossolúveis. Justificando a utilização de agentes emulsificantes. De acordo com Nascimento *et al.* (2017), os agentes emulsificadores como Tween 20, Tween 80, dentre outros, devem ser utilizados em concentrações que variem 05, a 20% em solução com OEs, nestas concentrações a interferência do agente emulsificador na susceptibilidade bacteriana ao óleo é mínima.

Segundo achados de Miranda e Rocha (2022) o 1,8-cineol é descrito como composto majoritário. O 1,8-cineol, é descrito com propriedades, antibacteriana, apresentando capacidade de penetrar na membrana citoplasmática, influenciando na permeabilidade e ocasionar a perda de material citoplasmático (SOUSA, 2012).

As diferenças nos resultados entre os estudos podem ser explicadas pela alteração da composição química dos OEs, que pode ser alterada por fatores bióticos e abióticos como, genética, temperatura, luminosidade e sazonalidade do local de plantio, estágio de desenvolvimento, horário da coleta da planta, água, nutrição e processamento pós-colheita (MORAIS, 2009).

Conclusão

O OE *Eucalyptus globulus* revelou um notável potencial antibacteriano contra às cepas bacterianas utilizadas neste estudo, o que indica um potencial uso como componente em agentes sanitizantes e como base para desenvolvimento de compostos eficazes no tratamento de infecções bacterianas. Contudo, estudos adicionais são necessários para uma compreensão dos mecanismos antibacterianos e possíveis efeitos tóxicos.

Referências

AHMAD, A. *et al.* Antifungal activity of Coriaria nepalensis essential oil by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against Candida. **Yeast**, v. 28, n. 8, p. 611-617, 2011.

BRITO, C. B. S. de. *et al.* The use of antibiotics and their relationship with multidrug-resistant bacteria in hospitals. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, p. e2129119852, 2020. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/9852>. Acesso em: 14 jul. 2023.

CERPELLI, C. *et al.* Effect of eucalyptus essential oil on respiratory bacteria and viruses. **Current Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 89-92, 2008.

CHOUHAN, S. SHARMA, K. GULERIA, S. Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 58, 2017.

CLSI (CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard M100, Wayne, PA: CLSI. 2019.

FURTADO, J.M. *et al.* Atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *Eucalyptus globulus*, *Justicia pectoralis* e *Cymbopogon citratus* Frente a bactérias de Interesse. **UNOPAR Cientif.: Ciênc. Biológ. Saúde**, v. 17, n. 4, p. 233-237, 2015.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

LIMA, S. D. *et al.* Antibacterial activity of citronellal and citronelol against strains of *Escherichia coli* ESB. **Archives of Health Investigation**, v. 9, n. 3, p. 238-241, 2020.

LISBOA, Thiago Costa.; NAGEL, Fabiano Marcio. Infecção por patógenos multirresistentes na UTI: como escapar?. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. São Paulo, v. 23, n. 2, p. 120-124, 2011.

LOUREIRO, R. J. *et al.* O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.

MIRANDA, D. M; ROCHA, D. P. Avaliação da atividade antibacteriana do extrato etanólico de folhas e cascas de *Eucalyptus globulus* Labill. frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Health and Pharmacy**, v.4, n.1, p. 27-38, 2022.

MULYANINGSIH, S. *et al.* Antibacterial activity of essential oils from *Eucalyptus* and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. **Pharmaceutical biology**, v. 49, n. 9, p. 893-899, 2011.

MONTEIRO, N. F. *et al.* Atividade do óleo essencial de *Eucalyptus Globulus* no controle de bactérias da cavidade oral. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 14, p. e60101420387, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i14.20091. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/20091>. Acesso em: 29 jun. 2023.

MOTA, V. S. TURRINI, R. N. T. POVEDA, V. B. Atividade antimicrobiana do óleo de *Eucalyptus globulus*, xilitol e papaína: estudo piloto. **Rev Esc Enferm USP**. v. 49, n. 2, p. 216-220. 2015.

MOUTASSEM, D. *et al.* Efficacy of essential oils of various aromatic plants in the biocontrol of Fusarium wilt and inducing systemic resistance in chickpea seedlings. **Plant Protection Science**, v. 55, n. 3, p.202–217, 2019.

MORAIS L. A. S. de. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, p. S4050-S4063, 2009.

NASCIMENTO, P. F. *et al.* Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17(1). p. 108-113, 2017.

OSTROSKY, E. A. *et al.* Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PANKEY, G.; SABATH, L. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram positives bacterial infections. **Oxford Journals**, v. 38, p. 864-865, 2013.

RAPPER, S. L, VUUREN, S. F. V. Odoriferous therapy: A review identifying essential oils against pathogens of the respiratory tract. **Chemistry & Biodiversity**. v. 17, n. 6, p. 2000062, 2020.

SANTOS, C. H. S, PICCOLI, R. H, TEBALDI, V. M. R. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e compostos isolados frente aos agentes patogênicos de origem clínica e alimentar. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 76, p. 17-19, 2017.

SERRA, E. *et al.* Antifungal activity of commercial essential oils and biocides against *Candida albicans*. **Pathogens**, v. 7, n. 1, p. 15, Jan. 2018.

SHARMA, A. *et al.* Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. **Journal of Bioscience and**

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Bioengineering, v. 123, n. 3, p. 308–313, 2017.

SILVA, M. T. N. *et al.* Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, p. 257-262, 2009.

SOUSA, J. P. **Aplicação dos fitoconstituintes carvacrol e 1,8-cineol como sanitizantes naturais em hortaliças folhosas minimamente processadas**. 2012. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2012.

TODESCATTO, G. C.; SALAME, A. L.; DALZOCHIO, T. Prevalência de bactérias com diferentes mecanismos de resistência antimicrobiana em amostras de swabs de vigilância de pacientes internados em uma unidade hospitalar de nova prata, RS. **Revista Saúde (Sta. Maria)**, v. 48, n. 1. 2022. Disponível em: <https://periodicos.ufsm.br/revistasauade/article/view/71277/51788>. Acesso em: 15 jul. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Antimicrobial Resistance, **Fact Sheet**. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acesso em: 03 ago. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World Antimicrobial Awareness Week, **WHO**. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/campaigns/world-antimicrobial-awareness-week/2020>. Acesso em: 27 jul. 2023.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).