

## PROTOCOLO PARA A DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) EM DIFERENTES TEMPOS DE AÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Carolina Melchior (PIBIC), Nathália Righi Pessôa da Silva, Milene Ribeiro da Silva, Cristiane Mengue Feniman Moritz (Orientador), e-mail: crisfeniman@yahoo.com.br.

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Tecnologia / Umuarama, PR.

### Ciências Biológicas III / Microbiologia / Bacterologia

**Palavras-chave:** Concentração Bactericida Mínima, atividade antimicrobiana, óleos essenciais.

**Resumo:** O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) em diferentes tempos de interação dos óleos essenciais com as bactérias alvo, como uma alternativa para obter a informação do tempo necessário que um óleo essencial, em diferentes concentrações, requer para causar a morte bacteriana. Foi utilizado o método de microdiluição em placas para testar os óleos essenciais de alecrim, capim-limão, cravo-da-índia, laranja, limão Tahiti e tomilho, *contra Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosembach e *Escherichia coli*. As microplacas foram replicadas com auxílio de um replicador nos tempos de 3, 6, 9 e 24 horas), com determinação da CMB em cada tempo de contato com os óleos essenciais. Pelo protocolo proposto neste estudo, foi possível verificar que houve maior necessidade de tempo de contato entre os óleos essenciais e as células bacterianas de *Escherichia coli* para alcançar as CBMs, estabelecidas em 24 horas. Para as células de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosembach as CBMs já foram detectadas nas primeiras horas de incubação.

### Introdução

Nos estudos sobre a atividade antimicrobiana de óleos essenciais ou outras substâncias antimicrobianas, comumente são empregados métodos para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). No entanto, o ponto final considerado como CIM não permite uma visão sobre o processo de morte que ocorre durante um período de incubação de 24 horas na presença do agente antimicrobiano. Além da CIM, informações confiáveis sobre a propriedade microbicida de um agente antimicrobiano é essencial para o sucesso do tratamento de infecções (Hamoud et al., 2012) ou o tempo necessário para exercer um efeito conservante eficaz em produtos alimentícios ou cosméticos.

O ensaio de curva de morte microbiana é um método refinado e preciso para os estudos de mecanismo de ação de substâncias antimicrobianas

(Albano et al., 2016). A curva de morte é normalmente executada com a determinação de células viáveis, sendo um método dispendioso quanto à demanda de materiais necessários para o plaqueamento das diluições requeridas, para alcançar valores seguros nas contagens de colônias.

Diante do elevado custo e mão de obra intensa para executar diversas diluições e plaqueamentos em curtos intervalos de tempo, buscou-se uma alternativa para obter a informação do tempo necessário que um óleo essencial, em diferentes concentrações, requer para causar a morte bacteriana.

O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) em diferentes tempos de interação dos óleos essenciais com as bactérias alvo.

### **Materiais e métodos**

Utilizou-se óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) – extraído das folhas, capim-limão (*Cymbopogon schoenanthus*), cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllus*) – extraído das folhas, laranja (*Citrus aurantium*), limão Tahiti (*Citrus aurantifolia*) e tomilho (*Thymus vulgaris*), doados gentilmente pela empresa BySamia.

Através do método da microdiluição (CLSI, 2009) em microplacas determinou-se os tempos de morte bacteriana para as concentrações de 25,6, 12,8, 6,4, 3,2, 1,6, 0,8, 0,4, 0,2, 0,1 e 0,05  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  dos óleos essenciais, além de suas CIMs e Concentrações Bactericidas Mínimas (CBMs) contra as bactérias *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosembach INCQS 00381 (ATCC 29213) e *Escherichia coli* INCQS 00033 (ATCC 25922), provenientes da Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária – CMRVS, FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. As microplacas foram incubadas em aerobiose a 37 °C por 24 horas no total.

Nos tempos de 3, 6, 9 e 24 horas de incubação foi realizado o repique das placas com o auxílio de replicador de 96 poços estéril (Scienceware®), realizando os repiques com 10  $\mu\text{L}$  de cada poço em placas de Petri contendo Ágar Muller Hinton (MHA). As placas de MHA foram incubadas em condições de aerobiose a 37 °C por 24 horas, para a observação de crescimento bacteriano e determinação da CBM.

Após o último repique das microplacas foi adicionado o indicador resazurina para a leitura de CIM e as microplacas permaneceram sob refrigeração a 7 °C (*overnight*) para a realização da leitura. O desenvolvimento de coloração rosa nos poços da microplaca indicou o crescimento bacteriano e a permanência da coloração azul indicou a inibição bacteriana.

Para cada bactéria foram destinadas quatro linhas na microplaca, obtendo-se então quatro replicatas. A CIM e a CBM foram consideradas a menor concentração com inibição e morte bacteriana, respectivamente, em pelo menos em três replicatas.

## Resultados e Discussão

Os valores encontrados como a CIM dos óleos essenciais em estudos encontram-se na Tabela 1.

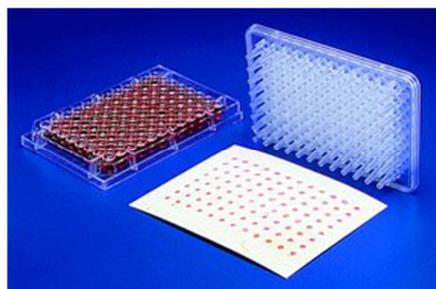
**Tabela 1** – Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos óleos essenciais.

Óleo essencial	CIM ( $\mu\text{L.mL}^{-1}$ )	
	<i>Staphylococcus aureus subsp. Aureus, Rosembach ATCC 29213</i>	<i>Escherichia coli ATCC 25922</i>
Alecrim	12,8	3,2
Capim-limão	3,2	3,2
Cravo	12,8	6,4
Laranja	> 25,6	> 25,6
Limão Tahiti	> 25,6	> 25,6
Tomilho	25,6	25,6

A leitura da CBM realizada em diferentes tempos de incubação da microplaca foi realizada após a incubação das placas repicadas. Na Figura 1A é apresentado um exemplo do repique das microplacas em MHA após incubação e na Figura 1B a imagem do replicador utilizado.



A



B(\*)

**Figura 1** – (A) Leitura da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo de alecrim. Repique da microplaca realizado 24 horas após a incubação. (B) Imagem do replicador. (\*) Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/z370819?lang=pt&region=BR>

O replicador utilizado é autoclavável e permite o repique de todos os poços em um único movimento. Foram utilizadas placas com 150 mm de diâmetro, preparadas com MHA para receberem os repiques.

Na tabela 2 encontra-se os valores de CBM para os óleos essenciais em cada intervalo de tempo de incubação das microplacas. Neste estudo não foi detectada atividade bactericida para os óleos essenciais de laranja, limão Thaiti e tomilho, mesmo na maior concentração testada ( $25,6 \mu\text{L.mL}^{-1}$ ).

Foi possível observar que nas primeiras três horas de contato com as células de *Staphylococcus aureus subsp. Aureus, Rosembach* (Gram positiva) já houve a ação efetiva dos óleos essenciais de alecrim e cravo na CBM final ( $12,8 \mu\text{L.mL}^{-1}$ ). Para o óleo essencial de capim limão, foram necessárias nove horas de contato para a ação da CBM final ( $12,8 \mu\text{L.mL}^{-1}$ ). Já para a bactéria Gram negativa *Escherichia coli* a ação efetiva da CBM dos óleos essenciais de capim limão e cravo foi alcançada com somente 24 horas de incubação.

**Tabela 2** – Concentrações Bactericidas Mínimas (CBM) em  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  dos óleos essenciais em cada intervalo de tempo de incubação, contra *Escherichia coli* (25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213).

Óleo essencial	CBM ( $\mu\text{L.mL}^{-1}$ ) <i>Escherichia coli</i> (25922).				CBM ( $\mu\text{L.mL}^{-1}$ ) <i>Staphylococcus aureus subsp. Aureus, Rosembach</i> (ATCC 29213).			
	3h	6h	9h	24h	3h	6h	9h	24h
Alecrim	>25,6	6,4	3,2	3,2	12,8	12,8	12,8	12,8
Capim-limão	12,8	12,8	6,4	3,2	6,4	6,4	3,2	3,2
Cravo	>25,6	>25,6	25,6	12,8	12,8	12,8	12,8	12,8
Laranja	>25,6	>25,6	>25,6	>25,6	>25,6	>25,6	>25,6	>25,6
Limão Tahiti	>25,6	>25,6	>25,6	>25,6	>25,6	>25,6	>25,6	>25,6
Tomilho	>25,6	>25,6	>25,6	>25,6	>25,6	>25,6	>25,6	>25,6

Desse modo, é possível sugerir uma ação mais lenta dos óleos essenciais em efetivamente matar as bactérias Gram negativas, pela possibilidade de interação dos compostos químicos dos óleos essenciais com os lipopolissacarídeos da membrana externa, retardando o alcance dos mesmos na membrana celular, principal alvo de ação dos componentes dos óleos essenciais.

### Conclusões

Dos seis óleos essenciais em estudo, foi possível detectar a atividade antibacteriana de três deles nas concentrações estabelecidas. Pelo protocolo desenvolvido para a determinação de CBM durante o período de incubação das microplacas foi possível verificar que houve maior necessidade de tempo de contato entre os óleos essenciais e as células bacterianas de *Escherichia coli* para alcançar as CBMs, estabelecidas em 24 horas. Para as células de *Staphylococcus aureus subsp. Aureus, Rosembach* as CBMs já foram detectadas nas primeiras horas de incubação.

### Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa acadêmica concedida para a realização deste estudo.

### Referências

Albano, M. et al. Antibacterial and anti-staphylococcal enterotoxin activities of phenolic compounds. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 38, p. 83-90, 2016.

Clinical and Laboratory Standards Institute / National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI/NCCLS). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Wayne: CLSI/NCCLS document M7-A8, 2009.



Hamoud, R. et al. Antimicrobial activity of a traditionally used complex essential oil distillate (Olbas® Tropfen) in comparison to its individual essential oil ingredients. **Phytomedicine**, v. 19, p. 969–976, 2012.