

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Croton rhamnifolioides*

Anallu SANTOS (1); Sofia Suely Ferreira Brandão RODRIGUES (2); Eduardo José Alcécio de OLIVEIRA (3)

- (1) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco, Av. Prof. Luiz Freire, 500, CDU, Recife-PE, 50.740-540, e-mail: anallu.santos@gmail.com
(2) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco, Av. Prof. Luiz Freire, 500, CDU, Recife-PE, 50.740-540, e-mail: andaorodrigues@gmail.com
(3) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco, Av. Prof. Luiz Freire, 500, CDU, Recife-PE, 50.740-540, e-mail: edualec@oi.com.br

RESUMO

Óleo essencial é uma mistura complexa de compostos orgânicos voláteis, com até centenas de constituintes distintos, extraídos de vegetais por processos diversos. O óleo essencial em teste foi obtido de folhas de *Croton rhamnifolioides*, pertencente à família *Euphorbiaceae*, que é geralmente encontrada no Nordeste brasileiro e popularmente conhecida como “quebra-faca”. O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *C. rhamnifolioides* sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e *Candida albicans* ATCC 10231. Foi utilizado o teste de difusão em disco com amostras do óleo puro e suas diluições (50%, 10%, 5% e 2,5%) e discos controle para bactérias de ciprofloxacina 5 µg, eritromicina 15 µg, penicilina G 10 µg e controle antifúngico de fluconazol 25 µg e anfotericina B 100 µg. As amostras do óleo essencial não mostraram atividade frente às bactérias, porém foi ativo contra a levedura testada.

Palavras-chave: Óleo essencial, *Croton rhamnifolioides*, difusão em disco, atividade antimicrobiana, “quebra-faca”.

1. INTRODUÇÃO

Óleo essencial é uma mistura complexa de compostos orgânicos voláteis, com até centenas de constituintes distintos, extraídos de vegetais por processos diversos. As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais, produtos de seu metabolismo secundário, têm sido reconhecidas empiricamente durante séculos, mas foram confirmadas cientificamente apenas recentemente. Extratos e óleos essenciais de plantas mostraram-se eficientes no controle do crescimento de uma ampla variedade de microorganismos, incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias. Usos práticos dessas atividades são sugeridos em humanos e animais, bem como na indústria de alimentos (DUARTE, *et.al.*, 2006).

O teste de disco-difusão em ágar foi descrito em 1966 por BAUAER & KIRBY e fornece resultados qualitativos da atividade antimicrobiana. É um dos métodos de suscetibilidade mais simples, confiável e mais utilizado pelos laboratórios de microbiologia. O seu princípio básico é a difusão do agente antimicrobiano no ágar, a partir de um disco impregnado com o produto. O tamanho dos halos formados por este antimicrobiano indica a susceptibilidade do microrganismo testado.

O óleo essencial em teste foi extraído de folhas de *Croton rhamnifolioides*, planta pertencente à família *Euphorbiaceae*, que é geralmente encontrada no nordeste brasileiro. É conhecida pelas pessoas da região por “quebra-faca” ou “catinga-branca”. Tem a forma de um subarbusto ou arbusto e é popularmente usada no tratamento de úlceras, inflamações e hipertensão. As principais substâncias químicas encontradas no gênero *Croton* são os alcalóides, flavonóides e terpenóides (RANDAU, *et. al.*, 2004).

Os alcalóides são substâncias orgânicas cíclicas, contendo um nitrogênio em estado de oxidação negativo, cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos. Confere gosto amargo, toxicidade, reserva de nitrogênio e proteção às plantas (PELLETIER, 1983). Os flavonóides são pigmentos naturais presentes nos vegetais que desempenham um papel fundamental na proteção contra agentes oxidantes, como por exemplo,

os raios ultravioletas, a poluição ambiental, entre outros, e atuam também como agentes terapêuticos num elevado número de patologias, tais como arteriosclerose e cancro (MARTÍNEZ-FLORES, 2002). Já os terpenóides são hidrocarbonetos naturais de cadeia aberta ou cíclica, cujas estruturas se podem considerar derivadas do isopreno. Estão universalmente presentes em pequenas quantidades em organismo vivos, onde desempenham numerosos papéis vitais na fisiologia das plantas bem como funções importantes nas membranas celulares. Por outro lado, também são em muitos casos acumulados, apresentando extraordinária variedade de estruturas, possivelmente devido a um papel de comunicação, defesa ou mesmo evolucionário dos vegetais (PASSOS, *et. al.*, 2009).

A constante procura por produtos naturais ativos e novas drogas com atividades antimicrobianas, justifica a análise para verificação preliminar de atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Croton rhamnifolioides*. Este trabalho destacou-se por seu pioneirismo, uma vez que revisada a literatura, não foi observado nenhum trabalho sobre atividade antimicrobiana da espécie em estudo.

3. METODOLOGIA

3.1. Obtenção do Óleo Essencial

O óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* foi obtido de folhas secas sob calor natural e submetidas ao método de hidrodestilação tipo Clevenger durante 30 minutos, que consiste basicamente na destilação por arraste de vapor com eventual adição de sulfato de sódio anidro. Foram aplicados em cada disco de papel de 6 mm estéril, sem antibiótico, 10µL de amostra do óleo puro e das amostras dissolvidas em Tween 80 estéril 1%, nas concentrações de 10%, 5% e 2,5% do óleo para as bactérias e 50%, 10% e 5% do óleo para a levedura.

3.2. Método de Disco-Difusão em Ágar

Os microorganismos-teste foram analisados com base nas normas M100-S15 e M2-A8 para teste de difusão em disco prescrito pela CLSI (antigo NCCLS) e cada ensaio foi repetido três vezes, em dias diferentes. As cepas selecionadas foram da coleção ATCC (American Type Culture Collection), especificamente: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e *Candida albicans* ATCC 10231. Os microrganismos foram submetidos a teste com o óleo essencial e suas diluições e antibióticos controle. Em todos os testes foi utilizado controle negativo com solução de Tween 80 a 1%. Os antibióticos controles foram a Ciprofloxacina 5µg para *E. coli* e *Salmonella*, Eritromicina 15 µg e Penicilina G 10 µg para *S. aureus* e Fluconazol 25 µg e Anfotericina B 100 µg para *C. albicans*.

O método consistiu do uso de placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo ágar Mueller-Hinton para as bactérias e ágar Sabouraud para a levedura. Para inoculação foi utilizado swab estéril embebido em uma suspensão padrão microbiana contendo aproximadamente 1 a 2×10^8 UFC/mL (McFarland 0,5). Discos de papel estéreis de 6 mm contendo os extratos teste e os discos controle foram aplicados às placas, que em seguida foram incubadas a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}/24$ horas para bactérias e $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}/24$ horas para levedura. Os halos de inibição foram medidos em milímetros, utilizando paquímetro.

4. RESULTADOS

Frente às bactérias o óleo puro e suas diluições de 10%, 5% e 2,5% não apresentaram atividade, uma vez que não houve formação de halos de inibição (Figura 1). Os discos controle de antibióticos apresentaram as inibições de crescimento esperadas (Figura 2), de acordo com as tabelas 2A-2I e 3 da norma M100-S15 do CLSI.



Figura 1 – Placa contendo discos com óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* puro (OP) e suas diluições de 10% (O 1/2), 5% (O 1/4) e 2,5% (O 1/8)



Figura 2 – Placa contendo discos comerciais de antibióticos: Penicilina G 10µg (Halo maior) e Eritromicina 15 µg

Frente à levedura *Candida albicans* ATCC 10231 o óleo puro e sua diluição a 50% mostraram uma considerável inibição, com um halo para o produto puro maior que o formado pelos antibióticos controle (Tabela 1). Os discos controle negativo (solução de Tween 1%) não apresentaram halos de inibição, como esperado.

Tabela 1 – Halos de inibição do óleo essencial de *C. rhamnifolioides* e dos controle

Microorganismo	Antimicrobiano	Halo (mm)*	Faixa de diâmetro controle (mm)**	Classificação do microorganismo***
<i>E. coli</i> ATCC 25922				
	Ciprofloxacina 5µg	35	31 – 40	S
	Óleo essencial puro	0		R
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076				
	Ciprofloxacina 5µg	33	31 – 40	S
	Óleo essencial puro	0		R
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028				
	Ciprofloxacina 5µg	30	31 – 40	S
	Óleo essencial puro	0		R
<i>S. aureus</i> ATCC 25923				
	Eritromicina 15µg	21	22 – 30	S
	Penicilina 10µg	40	36 – 37	S
	Óleo essencial puro	0		R
<i>C. albicans</i> ATCC 10231				
	Fluconazol 25 µg	0	SC	SC
	Anfotericina B 100 µg	11		
	Óleo essencial puro	24		
	Óleo essencial 50%	10		

SC - Sem classificação; * Média de ensaios em triplicata em dias diferentes. ** De acordo com a tabela 3 – Limites aceitáveis para as cepas de controle de qualidade usadas para monitorar a acurácia dos testes de discos difusão de organismos não fastidiosos em meio Mueller-Hinton sem sangue ou outros suplementos da norma M100-S15 CLSI. *** De acordo com a tabela 2A-2I CLSI - Padrões interpretativos dos halos de inibição e dos pontos de corte equivalentes: das concentrações inibitórias mínimas (CIM).

5. ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Já foi verificado que, os testes de difusão em disco podem ter vários interferentes, como a volatilidade do óleo, a dificuldade de se difundir no ágar, sua insolubilidade em água e complexidade química. Além disso, é bastante complicado comparar os resultados, visto que não existe uma padronização para a técnica a ser utilizada neste tipo de ensaio. (NASCIMENTO, *et. al*, 2007).

Como os controles positivos (antibióticos) apresentaram os halos esperados, pode-se então concluir que a técnica de difusão em disco foi corretamente desenvolvida. Se o óleo essencial não mostrou atividade, significa que, pelo menos sobre as cepas bacterianas testadas, ele não possui efeito inibitório. Contudo, para a cepa de *Candida*, é observada uma atividade bastante significativa, visto que seu halo é superior aos halos dos antibióticos utilizados neste experimento.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo mostraram em teste de difusão em disco que o óleo essencial de *C. rhamnifolioides* não apresentou atividade antimicrobiana sobre as cepas de bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), em nenhuma das concentrações testadas, mas apresentou excelente atividade frente a cepa de *Candida albicans* (ATCC 10231) quando concentrado e diluído a 50%.

6. AGRADECIMENTOS

Ao IFPE pelo financiamento da bolsa PIBIC Técnico 2009/2010 e ao INCQS pela doação das cepas padrão controle de microrganismos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOTELHO, M. A.; Nogueira, N. A. P.; Bastos, G. M.; Fonsceca, S. G. C.; Lemos, T. L. G.; Matos, F. J. A.; Montenegro, D.; Heukelbach, J.; Rao, V. S.; Brito, G. A. C.. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens, **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 40 n. 3, 2007.

NASCIMENTO, P. F. C.; Rodrigues, C. S.; Antonioli, A. R.; Santos, P. O.; Trindade, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Rev. Bras. Farm.** v. 17, n.1, 2007.

NCCLS/CLSI, 2003. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição. M2-A8, vol. 23 N° 1.

NCCLS/CLSI, 2005. Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15º Suplemento Informativo. M100-S15, vol. 25 N° 1.

RANDAU, K. P.; Florêncio, D. C.; Ferreira, C. P.; Xavier, H. S. Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). **Rev. Bras. Farm.** v.14, n. 2, p. 89-96, 2004.

SILVESTRE, Raquel G.; Neves, Ilzenayde de A.; Moraes, Marcílio M.; Gomes, Cristianne A.; Nascimento, Ruth M.; Júnior, Cláudio P. A.; Câmara, Cláudio A. G. Atividade Acaricida do Óleo Essencial de Espécies do Gênero *Cróton* (Euphorbiaceae). 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia, 2008. Resumos SBQ. São Paulo, 2008.