Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de citrus sinensis contra cepa de escherichia coli de derivado cárneo

Evaluation of the antibacterial activity of the essential oil of citrus sinensis against meat derivative escherichia coli

***Daniel Rodrigues da Silva*[1]**
***Bernadete Santos*[2]**
***Millena de Souza Alves*[3]**
***Maria Alice Araújo de Medeiros*[4]**
***Abrahão Alves de Oliveira Filho*[5]**

RESUMO: Sérios problemas de saúde pública, dentre eles a resistência bacteriana aos antibióticos, tem se mostrado um sinal de alerta para o alto risco de doenças infecciosas, o que faz com que se busquem alternativas acessíveis e eficazes para a prevenção e controle de diversas afecções. O presente estudo tem como objetivo avaliar a antibacteriana do óleo essencial de *Citrus sinensis* contra cepa de *Escherichia coli* de derivado cárneo. Os ensaios foram realizados utilizando as técnicas de microdiluição em caldo em placas de 96 poços para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). Quanto aos resultados, observou-se que o óleo essencial de *Citrus sinensis* apresentou CIM de 1000 µg/ml, para a cepa testada. Para a CBM, foi observado um valor maior que 1000 µg/ml, apresentando-se como bacteriostática para a cepa testada. Assim, pode-se concluir que o óleo essencial de *Citrus sinensis* apresentou ação antimicrobiana significativa e foi considerado bacteriostático para cepa de *Escherichia coli* (*Ec* 45).

PALAVRAS-CHAVE: Fitoterapia. Saúde Pública. Microbiologia.

ABSTRACT: Serious public health problems, including bacterial resistance to antibiotics, have been shown to be a warning sign for the high risk of infectious diseases, which makes people seek accessible and effective alternatives for the prevention and control of various conditions. The present study aims to evaluate the antibacterial activity of the essential oil of Citrus sinensis against a meat-derived strain of Escherichia coli. Assays were performed using broth microdilution techniques in 96-well plates to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC). As for the results, it was observed that the essential oil of Citrus sinensis had a MIC of 1000 µg/ml for the tested strain. For CBM, a value greater than 1000 µg/ml was observed, presenting itself as bacteriostatic for the tested strain. Thus, it can be concluded that the essential oil of Citrus sinensis had a significant antimicrobial action and was considered bacteriostatic for the Escherichia coli strain (Ec 45).

KEYWORDS: Phytotherapy. Public health. Microbiology

DOI: https://doi.org/10.61223/coopex.v15i01.396

[1] Graduando em Ciências Biológicas - Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). E-mail: drs.daniel.d@gmail.com
[2] Mestranda em Ciência e Saúde Animal - Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). E-mail: bernadetes672@gmail.com
[3] Doutoranda em Ciência e Saúde Animal - Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). E-mail: millenaasouzaa@gmail.com
[4] Doutoranda em Ciência e Saúde Animal - Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). E-mail: medeirosallice22@gmail.com
[5] Professor Doutor da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). E- mail: abrahao.alves@professor.ufcg.edu.br

INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas no Brasil e no mundo, sobretudo as causadas por bactérias isoladas de alimentos, atrelada a resistência desses microrganismos, assumiram um caráter prevalente que mudaram o padrão epidemiológico nos últimos anos, sendo assim um problema emergente e reemergente (ALÓS, 2015; WALDMAN; SATO, 2016; LENG et al., 2017). Dessa forma, considerado um problema de saúde pública, as bactérias resistentes a antimicrobianos tem um alto impacto nas infecções associadas à assistência à saúde (IRAS), provocando milhares de mortes e trazendo uma visão de cenários futuros cada vez mais preocupante (BURRIEL *et al.,* 2020).

Dentre as principais espécies de patógenos causadores de infecções comunitárias e nosocomiais está a *Escherichia coli*, uma bactéria frequentemente encontrada nas infecções do trato urinário, e que apresenta fortes fatores de contaminação pelo fato de ser invasiva e provocar infecções severas, além disso apresenta um perfil de crescente resistência aos antimicrobianos (BARTOLETTI *et al.,* 2016; CUNHA *et al*., 2016; ALQASIM *et al.,* 2019).

Assim, o fator de mudança genética que provoca mutações aleatórias nos microrganismos podendo torná-los resistentes se associa ao fator do uso indiscriminado de antimicrobianos tornando o cenário multirresistente e cada vez mais preocupante frente as infecções bacterianas (LOUREIRO *et al*., 2016; COSTA *et al*., 2016).

A perspectiva atual em linhas de investigação científica, é buscar por meio da fitoterapia uma alternativa terapêutica eficaz e econômica através da avaliação das propriedades fitoquímicas, para o tratamento de diversas doenças (FEITOSA *et al.,* 2016). Desse modo, uma dessas vertentes mostra que os óleos essenciais são substâncias altamente utilizadas, já que são considerados os agentes antimicrobianos mais eficientes encontrados em plantas medicinais, além de apresentarem atividade antioxidante e anti-inflamatória (REIS *et al*., 2020; AVOLA *et al.,* 2020).

Nesse sentido, a espécie *Citrus sinensis* pertencente à família Rutaceae, se caracteriza como uma planta medicinal de porte médio originária da Ásia, conhecida popularmente como laranja doce, apresenta uma abundância de metabólitos secundários, e destaca-se por ser uma rica fonte de vitamina C, considerado um poderoso antioxidante (ETEBU; NWAUZOMA 2014). O óleo essencial de *C. sinensis* é constituído por aproximadamente 91,4% de D-limoneno sendo os 8,6% restantes referentes a uma mistura de outros terpenos e aldeídos

alifáticos, o que confere a esta planta ação antimicrobiana, bem como diversas outras atividades farmacológicas (FERRONATTO; ROSSI, 2018).

Portanto, como proposta investigativa o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial de *Citrus sinensis* contra cepa de *Escherichia coli* de derivado cárneo.

METODOLOGIA

Ensaios *in vitro*

Local de Estudo

Os ensaios laboratoriais foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Campina Grande, campus de Patos/PB.

Substância-Teste

O óleo essencial de *Citrus sinensis* foi adquirido da Indústria Quinarí®, Ponta Grossa-PR. Para a realização dos ensaios farmacológicos, a substância foi solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluída em água destilada. A concentração de DMSO utilizada foi inferior a 0,1% v/v.

Micro-organismos

Foi utilizada a cepa de *Escherichia coli* (*Ec* 45) isolado de derivado cárneo, que permaneceu mantida em Ágar Muller-Hinton (MH) a 4ºC. Os inóculos foram obtidos a partir de culturas *overnight* em MH a 37ºC e diluídas em salina estéril para obter concentração final de aproximadamente 1,5 x 10^8 unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL), ajustado pela turvação comparando-se com o tubo 0,5 da escala McFarland. (BONA *et al.,* 2014).

Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados nos ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana foram o meio líquido Muller Hinton e o meio sólido ágar Muller Hinton, O meio de cultura foi adquirido na Difco® e preparado de acordo com as instruções do fabricante.

Determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima)

A CIM foi determinada utilizando a técnica de microdiluição em placa de 96 poços com fundo em "U". Em uma placa de 96 cavidades, onde foi adicionado 100 µL caldo Mueller Hinton, duplamente concentrado e 100 µL do produto (óleo essencial de *Citrus sinensis*) em estudo, nas concentrações de 1000 a 31,2 µg/mL. A determinação da CIM foi conduzida com 10 µL do micro-organismo em cada cavidade, aproximadamente 1,5 x 10^8 UFC/mL. O penúltimo contendo 200 µL do caldo foi inoculado com a suspensão de micro-organismo, sendo o controlo do crescimento, e o último poço recebeu apenas 200 µL do caldo, sendo o concontrole negativo. O ensaio foi realizado em duplicata. As placas foram incubadas a 35ºC durante 24 horas. Após o tempo de incubação adequado dos ensaios com as bactérias, foi realizada a primeira leitura dos resultados. Em seguida, foram adicionados 20 µL de solução de resazurina sódica (SIGMA), em água destilada esterilizada na concentração de 0,01 % (p/v), reconhecido como indicador colorimétrico de óxido-redução para bactérias. A leitura se procedeu, visualmente, pela ausência ou presença de crescimento do microrganismo pela formação de aglomerado de células (botão). E também pela observação da mudança da coloração da solução, de azul para rosa, indicando crescimento do mesmo. Foi feita uma nova incubação a 37 ºC. A CIM foi determinada como a menor concentração do produto que inibiu o crescimento visível do microrganismo e também pela observação da mudança da coloração da solução, de azul para rosa, indicando crescimento do micro-organismo. Portanto, foi determinada como CIM, a menor concentração do produto capaz de inibir o crescimento do micro-organismo ensaiado, verificado por uma não mudança da coloração do corante indicador (PALOMINO *et al.,* 2002; OSTROSKY *et al.,* 2008; CLSI, 2012; BONA *et al.,* 2014).

Determinação da CBM (Concentração Bactericida Mínima)

Após a leitura dos resultados, foram feitos inóculo (10 µL) de até três diluições anteriores ao valor da CIM para o meio de caldo Mueller-Hinton (100 µL/cavidade) em placa de microdiluição esterilizada para a determinação da CBM. Após a incubação a 37 ºC por 24 horas foi adicionado 20 µL de resarzurina. Os ensaios foram incubados a temperatura de 37ºC por mais 24 horas para confirmação da concentração capaz de inibir o crescimento total das espécies bacterianas, verificado por uma não mudança da coloração do corante indicador (NCUBE *et al.,* 2008; GUERRA *et al.,* 2012).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Yap e colaboradores (2014), destacam em seu trabalho, que as pesquisas no âmbito da utilização de produtos naturais vêm crescendo a cada ano, destacando os óleos essenciais como um possível agente modificador da resistência bacteriana, bem como suas demais propriedades terapêuticas. Desse modo, mostra que a fitoterapia é uma alternativa que vem sendo alvo de estudos com bastante frequência.

Os resultados encontrados acerca da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Citrus sinensis* contra a cepa de *Escherichia coli* encontram-se descritos nas tabelas 1 e 2. Percebe-se que a CIM do óleo essencial testado foi capaz de inibir o crescimento bacteriano na maior concentração, de 1000 µg/ml, já o valor de CBM encontrado foi acima de 1000 µg/ml.

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima (CIM) em µg/mL do óleo essencial de *Citrus sinensis* contra cepa de *Escherichia coli.*

Cepa bacteriana/ Substância	***Escherichia coli* *Ec* 45**
1.000 µg/mL	+
500 µg/mL	-
250 µg/mL	-
125 µg/mL	-
62,5 µg/mL	-
31,2 µg/mL	-

Legenda: (+) Inibiu o crescimento bacteriano (-) Não inibiu o crescimento bacteriano
Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Tabela 2 - Concentração Bactericida Mínima (CBM) em µg/mL do óleo essencial de *Citrus sinensis* contra cepa de *Escherichia coli.*

Cepa bacteriana/ Substância	***Escherichia coli* *Ec* 45**
1.000 µg/mL	-
500 µg/mL	-
250 µg/mL	-
125 µg/mL	-
62,5 µg/mL	-
31,2 µg/mL	-

Legenda: (+) Inibiu o crescimento bacteriano (-) Não inibiu o crescimento bacteriano
Fonte: Dados da pesquisa (2023)

Para uma atividade antimicrobiana ser considerada como forte, esta deve possuir a CIM de até 500 µg/mL, moderada para CIM de 600 a 1500 µg/mL e fraca para CIM acima de 1500 µg/mL (SARTORATTO *et al*., 2004). Desse modo, os resultados encontrados no presente estudo demonstram que a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Citrus sinensis* apresentou uma moderada inibição frente a cepa clínica de *Escherichia coli* (*Ec* 45), pois apresentou uma CIM de 1000 µg/mL.

Um composto para ser considerado bactericida ou bacteriostático de acordo com sua CBM, a sua concentração deve ser, respectivamente, igual ou duas vezes a CIM ou maior que duas vezes a CIM (HAFIDH *et al*., 2011). Os resultados obtidos demonstram que o óleo essencial de *Citrus sinensis* apresenta um potencial bacteriostático frente a cepa clínica de *Escherichia coli* (*Ec* 45)*,* pois sua CBM obtida foi acima de 1000 µg/mL.

Os resultados obtidos no presente trabalho, foram alcançados devido as propriedades químicas que constituem a espécie vegetal em estudo, onde o D-limoneno considerado composto majoritário encontrado no óleo essencial de *Citrus sinensis,* apresenta de forma comprovada, boa atividade antibacteriana (SOUZA *et al*., 2018; FERRONATTO; ROSSI, 2018).

Em estudos recentes, Everton e colaboradores (2020), concluíram que os óleos essenciais de *Pimenta dioica L. e Citrus sinensis* apresentam baixa toxicidade o que garante produzir mínimos efeitos adversos a saúde, além de apresentarem atividade antimicrobiana forte contra as espécies bacterianas testadas. Assim, evidenciando que a utilização de óleos essenciais vem tendo resultados promissores em estudos científicos *in vitro.*

Na mesma linha de investigação desse estudo, um trabalho utilizando óleos essenciais cítricos onde a maioria eram provenientes do gênero Citrus, o qual o óleo de Laranja doce faz parte, mostrou que os mesmos apresentam atividade antibacteriana contra cepas lácteas e

patogênicas, dentre elas a *Escherichia coli* (SANTOS *et al.,* 2016). Fato que comprova a eficiência do uso de óleos essenciais já que apresentam efeitos inibitórios frente às bactérias experimentadas.

Um estudo semelhante obteve resultados positivos, como o de Varona *et al*. (2013), o qual concluiu que o óleo essencial da *Lavandula hybrida* Grosso é um potente agente antimicrobiano contra cepas Gram-negativas e Gram-positivas, dentre essas, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Ainda, Silva e colaboradores (2019) comprovam em seu estudo que a espécie *Citrus x limonia*, apresenta atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, isso demonstra os benefícios encontrados na família Rutaceae, a qual a *Critus sinensis* pertence.

CONCLUSÃO

Nas condições do presente estudo, pode-se concluir que o óleo essencial de *Critus sinensis* apresentou ação antimicrobiana significativa e foi considerado bacteriostático para cepa de *Escherichia coli* (*Ec* 45). No entanto, mais pesquisas serão necessárias a fim de enfatizar sua eficácia contra diferentes tipos de microrganismos e posteriormente estudos *in vivo* para observar seu comportamento no organismo.

REFERÊNCIAS

ALÓS, J.I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global, Enfermedades Infecciosas y **Microbiología Clínica**, v. 33, p. 10, 2015.

ALQASIM, A. *et al*. Phenotypic microarrays suggest Escherichia coli ST131 is not a metabolically distinct lineage of extra-intestinal pathogenic E. coli. **Plos One**, v. 9, n. 2, p. 88374, 2014.

AVOLA, R. *et al*. Oregano (Origanum vulgare L.) essential oil provides anti-inflammatory activity and facilitates wound healing in a human keratinocytes cell model. **Food and Chemical Toxicology**, v. 144, 2020.

BARTOLETTI R, CA. et al. Tratamento de infecções do trato urinário e antibióticosmordomia. **Suplementos Europeus de Urologia**, v. (4), p. 81–87, 2016.

BONA, E.A.M. *et al*. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arq. Inst. Biol., São Paulo**, v.81, n.3, p. 218-225, 2014.

BURRIEL M. S. *et al.* Impacto de bactérias multirresistentes a medicamentos nos resultados terapêuticos e clínicos de prescritos aos cuidados de saúde em adultos: revisão sistemática e meta-análise. **Plos One**, v. 15, n. (1), p. 0227139, 2020.

CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically;Approved Standard—Ninth Edition.* CLSI document M07-A9. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2012.

COSTA., A. L. *et al*. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP), Macapá,** v. 7, n. (2), p. 45-57, 2016.

CUNHA MA. *et al*. Antibiótico padrões de resistência de infecções do trato urinário em um município do nordeste capitais brasileiras. **Instituto de Medicina Tropical de São Paulo,** 2016.

ETEBU, E.; NWAUZOMA, A.B. A review on sweet orange (*Citrus Sinensis* Osbeck): Health, diseases, and management. **American Journal of Research Communication***,* v. *2*, p. 33–70, 2014.

EVERTON, GO. *et al*. Caracterização química, atividade antimicrobiana e toxicidade dos óleos essenciais de Pimenta dioica L. e Citrus sinensis L. Osbeck. **Investigação, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 9, n. 7, 2020.

FEITOSA, M. H. A. *et al.* Inserção do conteúdo fitoterapia em cursos da área de saúde. **Revista Brasileira de Educação Médica**, v. 40, p. 197-203, 2016.

FERRONATTO, A. N.; ROSSI, R. C. Extração e aplicação do óleo essencial da casca da laranja como um ingredient natural. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v.12, n.2, p.78-93, 2018.

GUERRA FQS. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of cinnamomum zeylanicum blume essential oil on multi-drug resistant acinetobacter spp. strains . **Revista de Biologia e Farmacia**, v.8, n. 1, p. 62-70, 2012.

HAFIDH, R. R. *et al.* Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. **The open microbiology journal**, v. 5, p. 96, 2011.

LENG, X. et al. Enzymatic repairing amplification-based versatile signal-on fluorescence sensing platform for detecting pathogenic bacteria. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 252, p. 689-696, 2017.

LOUREIRO *et al.* O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, n. 01, p. 01 - 08, out.,2016.

NCUBE N.S. *et al.* Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. **African Journal of Biotechnology**, v.7, n. (12), p.1797-1806, 2008.

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

PALOMINO, J. C. *et al*. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistence Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v.46, p.2720-2722, 2002.

REIS, JB. *et al*. Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra patógenos alimentares. ***Brazilian Journal of Health Review***, v. *3*, n. (1), p.342–363, 2020.

SARTORATTO, A. *et al.* Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SANTOS, A. O. S. *et al*. Atividade antibacteriana e antioxidante de óleos essenciais cítricos com potencialidade para inclusão como aditivos em alimentos. ***Caderno De Ciências Agrárias*****,** v.*8,* n. (3), p.15–21, 2016.

SILVA, M. G. *et al.* Estudo químico e de atividade antibacteriana de extratos e óleo essencial de Citrus x limonia. ***Brazilian Journal of Health and Pharmacy***, v.*1,* n. (4), p.11–18, 2019.

SOUZA, I. S. *et al.* Atividade antibacteriana do D-limoneno simples e complexado com a βciclodextrina e em avaliação do potencial modulador associado com diferentes classes de antibióticos. In: **Anais do III Congresso Brasileiro de Ciências da Saúde, Editora Realize, Campina Grande**. 2018.

VARONA, S. *et al.* Antimicrobial activity of lavandin essential oil formulations against three pathogenic food-borne bacteria. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 243-250, 2013.

YAP, P. S. X. *et al.* Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. **The open microbiology journal**, v. 8, p. 6, 2014.

WALDMAN EA; SATO APS. Trajetória das doenças infecciosas no Brasil nos últimos 50 anos: um contínuo desafio. **Revista Saúde Pública**, p.50:68, 2016.