



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDULA HYBRIDA GROSSO CONTRA CEPAS DE *Escherichia coli*

Maria Alice Araújo de Medeiros¹, Millena de Souza Alves¹, Karla de Lima Alves Simão¹, Camilla Torres Pereira¹, Bruna de Lima Alves Simão¹, Hillzeth Luna Freire Pessoa², Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz², Abrahão Alves de Oliveira Filho³.

¹ Acadêmicas do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) – Campus Patos/PB.

² Professora da Universidade Federal da Paraíba (UFPB)- João Pessoa/PB

³ Professor do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) – Campus Patos/PB.

RESUMO

Objetivo: O presente estudo objetiva avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lavandula hybrida grosso* contra cepas de *Escherichia coli*. **Métodos e materiais:** Para realização da atividade antibacteriana utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo, obtendo a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM). Em uma placa de 96 poços, foi adicionado caldo *Mueller Hinton* e o óleo essencial em estudo nas diferentes concentrações. O ensaio foi realizado em duplicata. As placas foram incubadas a 37° durante 24 horas. A CIM foi determinada como a menor concentração do extrato que inibir o crescimento visível do microrganismo. Após a leitura da CIM, alíquotas de 20 µL foram retiradas de cada poço que não apresentar crescimento bacteriano, e transferidas para poços de uma nova placa, desprovidas de qualquer antimicrobiano. As placas inoculadas foram assepticamente fechadas e incubadas a 35 °C, e as Concentrações Bactericidas Mínimas (CBMs) foram registradas após 48 h. A CBM foi definida como a menor concentração do extrato que resultar em inibição visível do crescimento do microrganismo. **Resultados:** Observou-se para o óleo essencial de *Lavandula hybrida grosso* em estudo apresentou CIM₅₀ para *Escherichia coli* igual à 1024 µg/mL e valores acima de 1024µg/mL para a CBM. **Conclusão:** Diante dos resultados obtidos pode-se afirmar que o óleo essencial possui um efeito antibacteriano contra a *Escherichia coli*.

Descritores: Bactéria; Fitoterapia; Microbiologia.

EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL OF HYBRID LAVANDULA GROSSO AGAINST CEPAS DE *Escherichia coli*

ABSTRACT

Objective: This study aims to evaluate the antibacterial activity of *Lavandula hybrida* essential oil against strains of *Escherichia coli*. **Methods and materials:** To perform the antibacterial activity, a microdilution technique was used in broth, obtaining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (CBM). In a 96-

MEDEIROS MAA. et al. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de lavandula hybrida grosso contra cepas de *escherichia coli*.

Revista Saúde e Ciência online, v. 8, n. 2, (maio a agosto de 2019), p. 58-65.



well plate, Mueller Hinton broth and the essential oil under study at different concentrations were added. The assay was performed in duplicate. Plates were incubated at 37°C for 24-48 hours. The MIC was determined as a lower concentration than the inhibition of visible growth of the microorganism. After reading the CIM, aliquots of 20 µL were removed from each well that did not show bacterial growth, and transferred to wells of a new plaque, devoid of any antimicrobial. The inoculated plates were aseptically closed and incubated at 35 °C, and as Minimal Bactericides (CBMs) were after 48 h. CBM was defined as a lower concentration of the extract that results in inhibition of growth of the microorganism. **Results:** For the essential oil of *Lavandula hybrida* grosso in a study that presented CIM50 for *Escherichia coli* equal to 1024 µg / mL and higher than 1024 µg / mL for CBM50. **Conclusion:** In view of the obtained results it can be stated that the oil has essentially a antibacterial effect against *Escherichia coli*.

Keywords: Bacterium; Phytotherapy; Microbiology.

INTRODUÇÃO

Convém ressaltar, a princípio, que a *Escherichia coli* ou *E. coli* é considerada uma espécie bacteriana Gram-negativa pertencente à família das Enterobacteriaceae. Assim, é uma bactéria caracterizada morfológicamente com bacilos, não esporulados, e tendo por particularidade ser fermentadoras (1).

Nos dias atuais, é possível verificar que cada vez mais a resistência aos antibióticos se encontra constante, tornando-se um obstáculo para a humanidade, uma vez em que o seu uso de forma inadequada tem a capacidade de favorecer a seleção de bactérias multirresistentes. Diante disso, é evidente que o tratamento para os microrganismos patogênicos se encontra como uma problemática a ser solucionada (2).

É preciso salientar que em razão a multirresistência das bactérias estudos científicos tem se realizado com o intuito de desenvolver estratégias para contrapor esse cenário. Em análise, pode-se destacar que os países tropicais e em desenvolvimento, como o Brasil são considerados como excelentes alternativas capazes de proporcionar a inovação de novos produtos com atividade antimicrobiana, provenientes de espécies vegetais (3).

Outrossim, em razão ao atual cenário que a saúde mundial se encontra, várias pesquisas têm se realizado em busca por novas alternativas farmacológicas mais eficientes com potencial ação antimicrobiana com o intuito de eliminar bactérias resistentes aos antibióticos (4).

Diante do exposto, uma das alternativas que tem se optado recentemente são os óleos *Hybrida* essenciais advindos de plantas medicinais, os quais são ricos em compostos químicos, como os terpenos. Dessa forma, estes compostos podem se comportar de modo



individual, aditiva ou sinergicamente com propósito de contribuir quanto eficácia terapêutica de outras drogas, servindo assim de moléculas protótipos para estudos farmacológicos (5).

Desse modo, verifica-se que a lavanda ou alfazemas, assim conhecidas, pertence ao gênero *Lavandula* pertencente à Família Lamiaceae, na qual são consideradas como arbustos ou subarbustos eretos, com caules lenhosos e tendo como seu destaque o aroma. Dessa forma, a lavanda deriva do latim “lavare” significando “lavar” referindo-se justamente ao uso destas plantas aromáticas em banhos (6).

Sob esse viés, é válido evidenciar que o óleo essencial de *Lavandula Hybrid*a muitas vezes acaba não sendo muito bem visto pelas indústrias de perfumaria justamente por apresentar na sua composição elevados conteúdo de 1-8 cineol e de cânfora. Apesar disso, o óleo essencial de *Lavandula* é visto com imensa relevância na indústria farmacêutica pelo fato de ser considerado como um excelente agente antimicrobiano, comprovados em pesquisas contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Contudo, é preciso que seja realizado mais estudos sobre o seu potencial e mecanismo de ação (7).

Em suma, pode-se notar a capacidade farmacológica dos óleos essenciais, com intuito de contribuir para a humanidade. Dessa maneira, sabe-se que recentemente há o aumento da resistência de microrganismos patogênicos, devido a isso, surge a preocupação em busca de novas alternativas terapêuticas. Nesse sentido, o presente trabalho objetiva por meio de ensaios *in vitro*, avaliar a eficácia da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lavandula hybrida* Grosso.

METODOLOGIA

Ensaio *in vitro*

Local do estudo

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

Substância-teste

MEDEIROS MAA. et al. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *lavandula hybrida* grosso contra cepas de *escherichia coli*.

Revista Saúde e Ciência online, v. 8, n. 2, (maio a agosto de 2019), p. 58-65.



O óleo essencial de *Lavandula Hibrida* Grosso foi adquirido da Indústria Via Aroma® (Porto Alegre - RS). Para a realização dos ensaios farmacológicos, a substância foi solubilizada em DMSO e diluída em água destilada. A concentração de Dimetilsulfóxido (DMSO) utilizada foi inferior a 0,1% v/v. O antimicrobiano utilizado na execução dos testes como controle positivo foi o cloranfenicol, obtido da Sigma-Aldrich (São Paulo-SP).

Espécies Bacterianas

Para realização da atividade antibacteriana foram utilizadas bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* 101, *Escherichia coli* 102, *Escherichia coli* 103 e *Escherichia coli* 104, provenientes do Laboratório de Microbiologia da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, campus Patos, Paraíba.

Meio de cultura

Para realização do estudo da atividade antibacteriana, todas as cepas se mantiveram em meio *ágar Muller Hinton* a uma temperatura de 4 °C, sendo utilizados para os ensaios repiques de 24 horas em *Ágar Muller Hinton* incubados a 35 °C. Dessa forma, após a incubação foi efetuado o controle de turbidez, utilizando um inóculo bacteriano de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL padronizado de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland (8-9).

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial foi determinada através da técnica de microdiluição em caldo (8-9). Foram utilizadas placas de 96 poços estéreis e com tampa. Em cada poço da placa, foi adicionado 100 µL do meio líquido caldo *Muller Hinton* duplamente concentrado. Em seguida, 100 µL da emulsão do óleo na concentração inicial de 1024 µg/mL (também duplamente concentrado), foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada em razão de dois, serão obtidas as concentrações de 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 e 4 µg/mL, de modo que na primeira linha da placa encontra-se a maior concentração e na última, a menor concentração. Por

MEDEIROS MAA. et al. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *lavandula hybrida* grosso contra cepas de *escherichia coli*.

Revista Saúde e Ciência online, v. 8, n. 2, (maio a agosto de 2019), p. 58-65.



fim, foi adicionado 10 µL do inóculo de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL das espécies bacterianas nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa de bactéria, especificamente.

Conjuntamente, foi realizado o controle positivo com o antibacteriano cloranfenicol. Um controle de microrganismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100 µL do mesmo caldo *Muller Hinton* duplamente concentrado, 100 µL de água destilada estéril e 10 µL do inóculo de cada espécie. Para verificar a ausência de interferência nos resultados pelos solventes utilizados na preparação da emulsão, no caso o DMSO, foi feito um controle no qual foram colocados nas cavidades 100 µL do caldo duplamente concentrado, 100 µL de DMSO e 10µL da suspensão bacteriana. Além disso, também se realizou um controle de esterilidade do meio, na qual colocou-se 200 µL do caldo *Muller Hinton* em um orifício sem a suspensão das bactérias.

As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a 35°C por 24 horas para ser realizada a leitura. A CIM para o óleo essencial e o antibacteriano foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano verificado nos poços quando comparado com o crescimento controle. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A concentração bactericida mínima (CBM) do óleo em estudo também foi determinada para as cepas de bactérias. Após a leitura da CIM durante 24-48 horas, alíquotas de 20 µL foram retiradas de cada poço da placa de microtitulação que não apresentaram crescimento bacteriano, e transferidas para poços de uma nova placa de microtitulação contendo 100 µL de caldo *Muller Hinton*, desprovidas de qualquer antimicrobiano. As placas inoculadas foram assepticamente fechadas e incubadas a 35 °C, e logo após, as CBMs serão registradas após 48 h. Em análise, a CBM será definida como a menor concentração do óleo essencial que resultar em inibição visível do crescimento do microrganismo (10-11).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

MEDEIROS MAA. et al. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *lavandula hybrida* grosso contra cepas de *escherichia coli*.

Revista Saúde e Ciência online, v. 8, n. 2, (maio a agosto de 2019), p. 58-65.



A Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meio líquido foi determinada para o óleo essencial *Lavandula hybrida* Grosso nas diferentes concentrações explicitadas na metodologia e determinada pela menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano, conforme apresentado na **Tabela 1**. Dessa maneira, a partir dos resultados foi observado que a CIM da maioria das substâncias foi igual ou maior a 1024 µg/mL.

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi determinada a partir da menor concentração do extrato que resultou em inibição visível do crescimento do microrganismo. De acordo com a **Tabela 1**, na CBM (µg/mL) verifica-se que para todas as cepas foram maiores que 1024 µg/mL.

Tabela 1. Concentração mínima inibitória (CMI) e Concentração bactericida mínima (CBM) em µg/mL do óleo essencial de *Lavandula hybrida* grosso contra diferentes cepas de *Escherichia coli*.

Cepas <i>Escherichia coli</i>	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
<i>Escherichia coli</i> 101	1024	-
<i>Escherichia coli</i> 102	-	-
<i>Escherichia coli</i> 103	-	-
<i>Escherichia coli</i> 104	1024	-

(-) Concentrações encontradas maiores que 1024 µg/mL, não avaliadas neste estudo.

Segundo Sartoratto *et al.* (12), pode-se classificar a atividade antibacteriana como: forte, moderada e fraca. Sendo que, os valores entre 50-500 µg/mL é considerada como uma forte atividade, 600-1500 µg/ml apresentando uma moderada atividade e os valores acima de 1500 µg/ml como uma fraca atividade antibacteriana. Desse modo, observou-se que o óleo essencial da *Lavandula hybrida* grosso em estudo apresenta um poder inibitório de crescimento contra a *E. coli* considerado como moderado, pois a CIM₅₀ (Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir 50% das cepas) para *Escherichia coli* igual à 1024 µg/mL.

Conforme Hafidh *et al.* (13), para que um composto seja considerado bactericida ou bacteriostático de acordo com a Concentração Bactericida Mínima (CBM), esta deve ser igual ou duas vezes mais que a CIM ou a CBM deve ser maior que duas vezes a CIM, respectivamente. Verificando os resultados da CBM pode-se afirmar que o óleo essencial da *Lavandula hybrida* grosso não possui atividade bactericida contra espécies de *E. coli*, nas concentrações estudadas, pois os valores de CBM (Concentração Bactericida Mínima capaz de inibir 50% das cepas) foram maiores do que 1024 µg/mL frente às cepas.



De acordo com Bajalan *et al.* (14), pode-se verificar que o óleo essencial da lavanda constatou a presença de atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* e *Streptococcus agalactiae* e moderada a alta contra *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*. Além do mais, certificou que o óleo essencial lavandin (*Lavandula hybrida*) foi eficaz para inibir e/ou controlar cepas de bactérias, com destaque a *Escherichia coli*.

Além disso, os estudos de Jianu *et al.* (15) reforçaram que os óleos essenciais da lavanda (*L. Angustifolia* Miller) e lavandin (*Lavandula hybrida*) apresentam efeitos bactericidas de enorme significância em relação aos microrganismos, tais como *Shigella Flexneri*, *Staphylococcus Aureus* e *Escherichia coli*, apresentando fortes potenciais antimicrobianos e antifúngicos.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, observou-se um potencial antibacteriano do óleo essencial da *Lavandula hybrida* grosso *contra a Escherichia coli*, auxiliando futuramente no controle da resistência das bactérias aos antimicrobianos já existentes. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo de ação deste óleo.

REFERÊNCIAS

1. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS & Pfaller MAK. In: Enterobacteriaceae. Microbiologia Médica. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2002. cap. 29, p. 252.
2. COUTINHO, Henrique Douglas Melo et al. Atividade antimicrobiana in vitro de Geraniol e Cariofileno sobre Staphylococcus aureus. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2015a; 20(1): 98-105.
3. MARSH, P. D. Controlling the Oral Biofilm with Antimicrobials. Journal of Dentistry. 2010; 38(1): 11- 15.
4. IDSA, INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA. The 10x'20 initiative: pursuing a global commitment to develop 10 new antibacterial drugs by 2020. Clinical Infectious Diseases. 2010 v. 50: 1081-1083.
5. COUTINHO, Henrique DM et al. Avaliação comparativa da modulação de antibióticos, frente às cepas bacterianas de Escherichia coli, Staphylococcus aureus. Revista Ciencias de la Salud. 2015b; 13(3): 345-354.
6. BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. Plantas Aromáticas: do cultivo à produção de óleo essencial. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora Ltda, 2009. 160 p.çln
7. TARDUGNO, Roberta et al. Phytochemical composition and in vitro screening of the antimicrobial activity of essential oils on oral pathogenic bacteria. Natural product research. 2018; 32(5): 544-551.
8. CLEELAND R, SQUIRES E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections. In: Lorian, V. M. D. Antibiotics in Laboratory Medicine. New York: Willians & Wilkins, 1991; 739-788.

MEDEIROS MAA. et al. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de lavandula hybrida grosso contra cepas de *escherichia coli*.

Revista Saúde e Ciência online, v. 8, n. 2, (maio a agosto de 2019), p. 58-65.



9. HADACEK F, GREGER H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analyses*, 2000; 11: 137-147.
10. NCUBE N.S., AFOLAYAN A.J., OKOH A.I.. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African Journal of Biotechnology*.2008. 7(12):1797-1806.
11. GUERRA FQS, MENDES JM, OLIVEIRA WA, COSTA JGM; COUTINHO HDM, LIMA EO. CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *Cinnamomum zeylanicum* Blume ESSENTIAL OIL ON MULTI-DRUG RESISTANT *Acinetobacter* spp. strains . *Revista de Biologia e Farmacia*, v8 (1): 62-70, 2012
12. SARTORATTO A, MACHADO A, DELARMELENA C et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2004; 35(4): 275-280.
13. HAFIDH RR, ABDULAMIR AS, VERN LS et al. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. *Open Microbiol J*, 2011; 5: 96–106.
14. BAJALAN, Iman et al. Chemical composition and antibacterial activity of Iranian *Lavandula x hybrida*. *Chemistry & biodiversity*, 2017; 14, (7): e1700064.
15. JIANU, Calin et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of lavender (*Lavandula angustifolia*) and lavandin (*Lavandula x intermedia*) grown in Western Romania. *International journal of agriculture and biology*, 2013; (15) 4: 773-776.

MEDEIROS MAA. et al. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de lavandula hybrida grosso contra cepas de *escherichia coli*.

Revista Saúde e Ciência online, v. 8, n. 2, (maio a agosto de 2019), p. 58-65.