

**Composição Química do Óleo Essencial da *Ocotea diospyrifolia* (Mez)
(Lauraceae) e Ação Sinérgica****Chemical Composition of *Ocotea diospyrifolia* Essential Oil (Mez)
(Lauraceae) and Synergistic Action**

DOI:10.34117/bjdv6n12-677

Recebimento dos originais: 20/11/2020

Aceitação para publicação: 28/12/2020

Elisandra de Oliveira Santos

Mestre em Recursos Naturais - PGRN-UEMS

Cidade Universitária de Dourados

Rod. Dourados-Itahúm, Km 12 C.P. 351, CEP 79804-970 Dourados, MS, Brazil

e-mail: elisandra19892010@hotmail.com

Viviane Mallmann

Doutora em Recursos Naturais - PGRN-UEMS

Cidade Universitária de Dourados

Rod. Dourados-Itahúm, Km 12 C.P. 351, CEP 79804-970 Dourados, MS, Brazil

e-mail: mallmann.mn@gmail.com

Valdete de Souza Silva

Mestre em Recursos Naturais - PGRN-UEMS

Cidade Universitária de Dourados

Rod. Dourados-Itahúm, Km 12 C.P. 351, CEP 79804-970 Dourados, MS, Brazil

e-mail: vsilvams@gmail.com

Willian Ferreira da Costa

Professor Doutor Pesquisador do Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, Maringá, PR, CEP 87020-900, Brasil.

e-mail: wfcosta@uem.br

Etenaldo Felipe Santiago

Professor Doutor do Programa de pós-graduação em Recursos Naturais - PGRN-UEMS

Cidade Universitária de Dourados

Rod. Dourados-Itahúm, Km 12 C.P. 351, CEP 79804-970 Dourados, MS, Brazil

e-mail: felipe@uems.br

Euclesio Simionatto

Professor Doutor do Programa de pós-graduação em Recursos Naturais - PGRN-UEMS

Cidade Universitária de Dourados

Rod. Dourados-Itahúm, Km 12 C.P. 351, CEP 79804-970 Dourados, MS, Brazil

e-mail: euclesio@uems.br

Rogério Cesar de Lara da Silva

Professor Doutor do Programa de pós-graduação em Recursos Naturais - PGRN-UEMS
Cidade Universitária de Dourados Rod. Dourados-Itahúm, Km 12C.P. 351, CEP 79804-970
Dourados, MS, Brazil
e-mail: rcsilva@uems.br

RESUMO

Neste trabalho foram avaliados a composição química do óleo essencial da *Ocotea diospyrifolia* (Mez) (Lauraceae) através de técnicas cromatográficas e sua atividade antimicrobiana frente as bactérias gram-positivas *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e gram-negativas *Escherichia coli* e *Acinetobacter baumannii*. A extração do óleo essencial de folhas e cascas foi realizada em extrator de Clevenger por 6 h possibilitando um rendimento de 2,31 % para folhas e 0,22 % para as cascas. Cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama e por espectrometria de massas foi utilizado na análise e identificação dos constituintes do óleo. Na identificação da composição química para o óleo das folhas β -elemeno (12,40%) e espatulenol (21,79%) foram os compostos majoritários. Para o óleo obtido das cascas os sesquiterpenos α -copaeno (8,01%) e γ -cadineno (8,51%) foram os de maiores concentrações. O teste de sensibilidade antimicrobiano mostrou uma eficácia perante as bactérias gram-positivas *E. faecalis* e *S. aureus* diferentemente da bactéria gram-negativa *E. coli* que não mostrou nenhuma inibição por parte do óleo essencial testado. Para a *Acinetobacter baumannii* houve uma fraca atividade em relação ao óleo essencial da casca testada. O teste de sinergismo mostrou uma eficiência por parte do óleo essencial das cascas frente á bactéria gram- negativa *Acinetobacter baumannii*, portadora do gene de resistência *bla_{oxa-23}*. Houve uma redução de 4 horas no crescimento bacteriano em combinação entre o óleo e o antibiótico polimixina B.

Palavras chaves: óleo essencial, *Ocotea diospyrifolia*, antibióticos

ABSTRACT

In this work, the chemical composition of the essential oil of *Ocotea diospyrifolia* (Mez) (Lauraceae) was evaluated using chromatographic techniques and its antimicrobial activity against gram-positive bacteria *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and gram-negative *Escherichia coli* and *Acinetobacter baumannii*. The extraction of oil from leaves and peels of the essential oil was carried out in Clevenger extractor for 6 h, allowing a yield of 2.31% for leaves and 0.22% for peels. Gas chromatography with flame ionization detection and mass spectrometry was used in the analysis and identification of oil constituents. In the identification of the chemical composition for β -elemene (12.40%) and spatulenol (21.79%) leaf oil were the major compounds. For the oil obtained from the shells, the α -copaene (8.01%) and γ -cadinene (8.51%) sesquiterpenes were the ones with the highest concentrations. The antimicrobial susceptibility test showed efficacy against gram-positive bacteria *E. faecalis* and *S. aureus*, unlike gram-negative bacteria *E. coli*, which showed no inhibition by the essential oil tested. For *Acinetobacter baumannii* there was a weak activity in relation to the essential oil of the tested peel. The synergism test showed an efficiency on the part of the essential oil of the husks against the gram-negative bacteria *Acinetobacter baumannii*, which carries the *bla_{oxa-23}* resistance gene. There was a 4-hour reduction in bacterial growth in combination between the oil and the polymyxin B antibiotic.

Key words: essential oil, *Ocotea diospyrifolia*, antibiotics, synergism.

1 INTRODUÇÃO

A Lauraceae é uma importante família de Angiospermas e uma das famílias mais complexas da flora brasileira para identificação devido ao grande número de espécies e uso de caracteres enigmáticos para distinguir gênero e espécies (GONÇALVES, et al., 2018). Na família da Lauraceae são encontradas 52 gêneros e 2500 á 3500 espécies distribuídas amplamente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. No Brasil é representada por 23 gêneros e aproximadamente 420 espécies (SANTOS & ALVES, 2012).

Muitas espécies de Lauraceae já estudadas tem sido mostrado sua composição química e aplicação dos óleos frente a diversos patógenos. SILVA et al., (2009), mostrou a eficiência da ação antibacteriana do óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume - Lauraceae), frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. ABDELWAHAB et al., (2017), avaliou a composição química e propriedades aintioxidantes do óleo essencial *Cinnamomum altissimum* Kosterm (Lauraceae). GONTIJO et al., (2017), estudando a *Ocotea odorífera* (Lauraceae) avaliou a composição química do extrato aquoso das folhas e a correlação de sua composição química e atividade biológica.

Dentre estas espécies da Lauraceae está a *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez, conhecida popularmente por batalha, canela, canela-amarela, canela-louro, canelão, canelão-de-móveis, caneleiro, louro-amarelo. Na América do Sul ocorre na Bolívia, Argentina, Paraguai e no Brasil nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul (MORAES, 2005). Sua altura média atinge 20 metros e seu diâmetro é de 60 cm. O período de floração é de novembro a dezembro e frutificação de abril a maio, possui flores masculinas e femininas, seu fruto é uma baga globosa, em relação a apícola são amarelas e perfumadas atraindo assim muitos insetos, possui grande interesse por parte da construção civil (LORENZI, 1998). Não existem relatos na literatura de trabalhos relacionado a óleos essenciais para *O. diospyrifolia*. Dos SANTOS et al., (2013) trabalhando com diversas plantas do pantanal do estado de Mato Grosso do Sul, por meio de extratos do fruto das plantas demonstrou a atividade acaricida para o material vegetal.

O objetivo deste nosso estudo foi analisar e avaliar a composição química do óleo essencial obtido das folhas da *O. diospyrifolia*, uma vez que não tem sido relatada na literatura. Também são mostrado suas ações em cepas bacterianas gram-positivas e gram-negativas, assim como sua associação com antibióticos para verificar o efeito sinérgico sobre a bactéria *Acinetobacter baumannii* produtora da OXA-23.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As amostras de cascas e folhas das espécie *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez foram coletadas na zona rural da região do município de Japorã – Mato Grosso do Sul e transportada ao laboratório de química orgânica da UEMS, unidade de Naviraí. O material vegetal foi identificado no herbário DDMS da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) e o reconhecimento da espécie coletada foi realizada pelo prof. Dr. Etenaldo Felipe da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS).

2.2 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

As amostras de folhas e cascas coletados foram pesados, reduzidas em moinho de facas e submetidas à hidrodestilação por um período de 4 h, utilizando-se um aparelho extrator de Clevenger. O óleo essencial obtido na extração foi coletado com éter etílico, sendo posteriormente evaporado lentamente a temperatura ambiente. A remoção da água residual foi efetuada utilizando sulfato de sódio anidro. Os óleos livres de umidade foram acondicionados e pesados em frascos envoltos de papel alumínio e guardados sob refrigeração para uso posterior.

2.3 ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais foram submetidos à análise por cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG-EM) e por ionização de chama (CG-DIC). As análises por CG-EM foram realizadas por um Thermo-Finigan (Focus DSQ II) e amostrador automático modelo Triplus. A separação do óleo essencial foi realizada em coluna capilar DB5 (30 m x 0,25 mm D.I. x 0,25 μ m de filme) com 5 % de fenil-metilpolisiloxano. Hélio 5.0 grau analítico foi usado com gás de arraste com fluxo de 1,2 mL.min⁻¹. A temperatura programada do forno foi de 60°C (1 min), e elevação de 3°C.min⁻¹ até 240°C. A temperatura do injetor, fonte de ionização e linha de transferência foi de 230, 250 e 280°C, respectivamente. No modo de operação de cromatograma de íons totais (TIC) a faixa de aquisição de massas foi de 50 a 550 uma. A aquisição foi realizada por Software Xcalibur 1.4 SR1. A análise foi realizada por biblioteca NIST/MS Search 2.0. O cálculo do índice de retenção de Kovatz (IK) foi determinado utilizando-se uma mistura padrão de série homóloga de hidrocarbonetos C7-C30 (Sigma-Aldrich) para identificação dos compostos. Os IK calculados foram comparados aos da biblioteca de Adams (1995). As análises por CG-DIC foram realizadas em cromatógrafo a gás

modelo 6890N (Hewlett Packard–Agilent Technologies) equipado com software N2000 utilizando-se mesma tipo de coluna cromatográfica e condições de separação.

2.4 TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANO (TSA)

As cepas bacterianas analisadas foram *Escherichia coli* (ATCC SP 11229), *Enterococcus faecalis* (ATCC SP 19433) e *Staphylococcus aureus* (ATCC SP 25923). O teste seguiu os parâmetros da Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests (2003). Foram preparados uma suspensão das cepas bacterianas a ser estudadas em solução salina (NaCl 0,9%) para obter aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (escala de Mc Farland). Em seguida pressionou-se o *swab* contra a parede do tubo para retirar o excesso e distribuir o inóculo sobre a superfície do meio de cultura. Foi utilizado como controle um disco de cloranfenicol como padrão (30µg). Em cada placa de petri foi colocado um disco de papel (6 mm) absorvente e impregnado duas concentrações diferentes, sendo uma de 1 µL e outra de 5µL de óleo essencial a ser estudado. As análises foram realizadas em duplicatas, e posteriormente efetuadas a média dos halos apresentados. Foram preparadas placas de petri contendo 20 mL de ágar Müller-Hinton como meio de cultura base. As placas foram incubadas em estufa a 35 °C por 24 horas. Após este período, realizou-se a análise dos resultados através da observação e medida dos halos de inibição, através de paquímetro digital considerou-se com atividade antibacteriana o óleo que apresentou halo de inibição igual ou superior a 10 mm (TRAJANO *et al.*, 2009).

Para os testes realizado com bactéria gram-negativa a *Acinetobacter baumannii* produtora de carbapenemase, portadora do gene de resistência *bla_{oxa-23}* isolada de processo clínico humano foi obtida e caracterizada previamente no Laboratório de Microbiologia da UFGD. Os óleos das cascas e folhas foram testados pelo método de disco difusão em ágar segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013), com adaptações de HABBAL e colaboradores, (2011).

2.5 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A realização do teste Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizado com bactéria *Acinetobacter baumannii*, seguindo a metodologia de FANKAM e colaboradores, (2011) pelo método de microdiluição em placas. Para efetivar-se o teste a suspensão bacteriana foi realizada em solução salina com turvação correspondente a 1×10^6 UFC/mL. Primeiramente os óleos foram diluídos em água destilada estéril no qual foi possível obter a concentração de 16%. Considerando para essas diluições a densidade das substâncias igual a 0,9 g/mL. Após este

procedimento os mesmos foram adicionados em tubos de vidro estéril: 0,8 mL do óleo, 0,05 mL de Tween 80% e 4,2 mL de água destilada estéril e agitados por 5 minutos obtendo-se a concentração de 16% que corresponde a 144 mg/ mL. Individualmente nos poços das placas de microdiluição adicionaram-se 100 µL de caldo Müller-Hinton seguidamente inseriu-se 100 µL das emulsões dos óleos para adquirir a concentração inicial que foi de 8% (72 mg/mL) para a primeira linha da placa de microdiluição. Para obtenção das concentrações seguintes dos óleos foram realizadas a partir da diluição seriada na própria placa, partindo-se da concentração inicial de 8% até 0,0625%, pela transferência de 100 µL ao poço sucessor, para última linha retirou-se 100 µL do conteúdo de forma a coincidir com os volumes de todos os poços. Todos os testes foram realizados em duplicata. O controle de toxicidade foi realizado com Tween 80%, para a concentração utilizada para emulsão, a fim de averiguar se o mesmo não apresentaria atividade inibitória para a bactéria, a esterilidade do óleo foi verificada juntamente com o mesmo óleo mais o meio de cultura, de maneira que o mesmo fosse o controle positivo, a suspensão bacteriana em solução salina com turvação correspondente a 0,5 da Escala McFarland adicionada de polimixina B (antibiótico comercial) o controle negativo utilizado foi a suspensão bacteriana mais meio de cultura.

As placas foram incubadas a uma temperatura de 37 °C por 24 horas. Para revelação dos resultados, foi utilizada uma solução indicadora de resazurina sódica 0,01%. Após a incubação foram adicionados 30 µL da solução indicadora em cada cavidade e as placas incubadas pelo período de duas horas em estufa a 37 °C. A leitura dos resultados para determinação da CIM foi considerada como positiva para os orifícios que apresentaram coloração azul indicando ausência de crescimento visível e negativa os de coloração vermelha significando a presença de células viáveis (PESSOA *et al.*, 2005).

3 TESTE DE SINERGISMO UTILIZANDO O MÉTODO TIME-KILL

3.1 TÉCNICA DE DIFUSÃO EM MEIO SÓLIDO

Foi realizado o teste de interação dos óleos com antibióticos disponíveis comercialmente para verificar possíveis sinergismos através da técnica de difusão em meio sólido utilizando discos de papel filtro conforme Pessoa e colaboradores, (2005). O ensaio realizado para confirmar o efeito sinérgico foi o Time-kill ou curva de sobrevivência bacteriana na qual foi utilizada a técnica de microdiluição seguindo-se as diretrizes estabelecidas pelo Laboratory Standards Institute (CLSI). A confirmação da microdiluição foi realizada através da contagem bacteriana durante o período de incubação que foi monitorada paralelamente em quatro tubos

de ensaio contendo inicialmente apenas a bactéria (1×10^8 UFC mL⁻¹); no segundo tubo de ensaio contendo apenas a bactéria em uma concentração sub-inibitória de antibióticos que evidenciou um efeito sinérgico em combinação com óxido de etileno; no terceiro tubo contendo a bactéria em uma concentração sub-inibitória do óleo essencial que evidenciou um efeito sinérgico em combinação com o antibiótico (AB); e no quarto tubo a bactéria em uma concentração sub-inibitória de antibiótico juntamente com o óleo essencial.

O volume final de cada tubo foi de 10 mL e foram incubadas a 37 °C durante 24 h. As contagens bacterianas foram determinadas após 0, 4, 8, 12 e 24 h de incubação, espalhando diluições apropriadas em ágar de Muller Hinton (limite de detecção foi de 10^2 UFC.mL⁻¹). As placas foram incubadas a 37 °C e logo após as colônias bacterianas foram contadas. Os resultados das experiências foram realizados em triplicata. A interação é considerada como sendo eficaz e sinérgica, se a contagem de bactérias de partida (UFC.mL⁻¹) diminuir após 24 h de incubação por ≥ 2 log para o óleo essencial e antibiótico em combinação (KNEZEVIC et al., 2016). Os antibióticos utilizados em associação aos óleos essenciais perante a bactéria *A. baumannii* foram imipenem, piperacilina/tazobactam, ciprofloxacina, amicacina, polimixina B.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O óleo essencial das folhas e cascas da *O. diospyrifolia* apresentou rendimento 2,31% e 0,22%, respectivamente em sua extração. Por meio da CG-DIC e CG-EM, foi possível identificar 26 compostos no óleo essencial das folhas da *O. diospyrifolia*, representando 79,3% para CG-EM e 43,3% para CG-DIC, respectivamente da composição total do óleo (Tabela 1). O óleo apresentou em sua composição compostos exclusivamente de sesquiterpenos, com maior teor de compostos oxigenados (29,3% CG-EM; 10,8% CG-DIC), seguidos por hidrocarbonetos (47,9% CG-EM, 32,3% CG-DIC). Os principais compostos específicos identificados no óleo por CG-EM foram β – elemeno (12,4%), germacreno D (5,72%), elixeno (11,8), τ – elemeno (5,58%) e espatulenol (21,7%). Para o óleo essencial das cascas foi possível identificar 28 compostos, representando 73,2% do total para CG-EM e 50,2% para CG-DIC (Tabela 2). Na avaliação do óleo das cascas não ocorreu à presença de hidrocarbonetos monoterpenos. Entretanto, para compostos hidrocarbonetos sesquiterpenos foi de 59,08 % para CG-EM e de 36,08% para CG-DIC, respectivamente. Para os sesquiterpenicos oxigenados foi de 14,12% para CG-EM e 14,14% para CG-DIC, respectivamente. Os principais compostos específicos identificados no óleo por CG-EM foram α - copaeno (8,01%), α - humuleno (2,62%),

γ -cadineno (8,51%), elixene (6,45%) e cubenol (6,46%). Nas figuras 1 e 2 são mostrados os perfis cromatográficos para o óleo das flores e cascas respectivamente.

Figura 11. Cromatograma de íons totais obtidos por CG-EM para o óleo das folhas da *O.diospyrifolia*

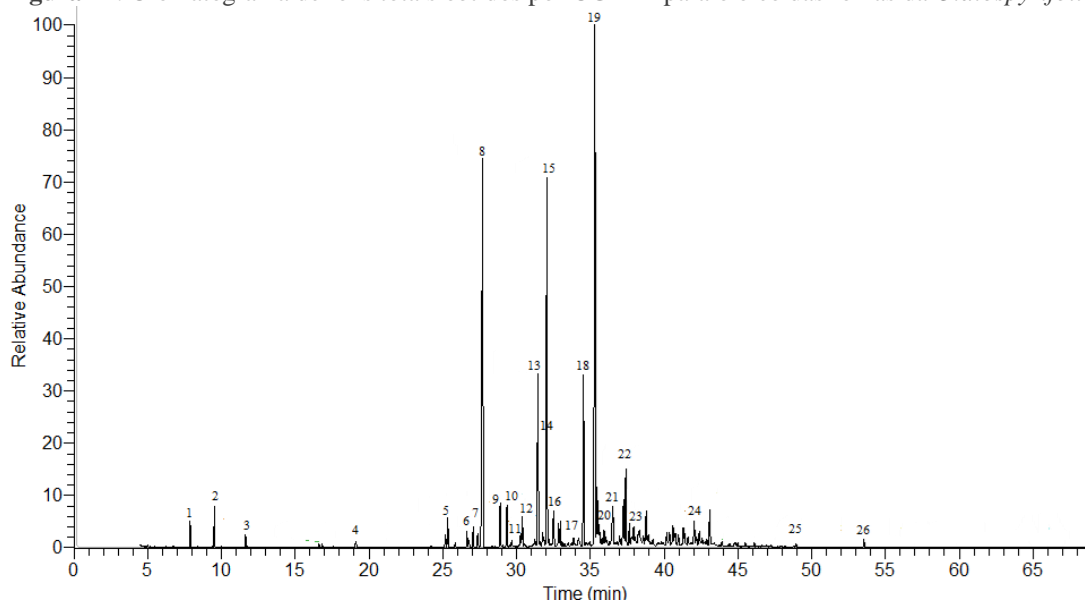


Tabela 1. Relação dos compostos identificados para o O.E. das folhas com índice de retenção e suas respectivas concentrações no CG-EM e CG-DIC.

Indicação numérica	Constituintes	TE ^{ret}	% CG-EM	% CG-DIC	IR ^{CAL}	IR ^{LIT}
Hydrocarbonetos monoterpênicos						
1	α - pineno	7,87	0,53	0,58	927	932
2	β - pineno	9,54	0,96	0,44	973	974
3	β - terpinilacetato	11,64	0,33	0,32	1025	N
Monoterpeno oxigenado						
4	Mirtenol	19,11	0,28	0,93	1192	1195
Hydrocarbonetos sesquiterpênicos						
5	δ - elemeno	25,34	1,15	1,09	1331	1335
6	α -ylangeno	26,78	1,26	0,53	1364	1373
7	copaeno	27,06	0,59	0,34	1371	1374
8	β - elemeno	27,71	12,40	7,37	1386	1389
9	cariofileno	28,90	1,48	0,60	1536	N
10	1-methylethylideno	29,35	1,27	1,17	1422	N
11	β - chamigreno	30,27	1,27	0,48	1470	1476

12	α – cariofileno	30,39	1,53	0,19	1450	1464
13	germacreno D	31,47	5,72	5,38	1476	1484
14	β – selineno	31,77	0,77	0,65	1483	1489
15	elixeno	32,07	11,84	10,28	1491	N
16	α – bulneseno	32,50	1,20	1,32	1501	1509
17	δ – cadineno	32,97	1,80	0,31	1513	1513
18	τ – elemeno	34,53	5,58	0,30	1553	N
				32,28		
Sesquiterpenos oxigenados						
19	espatulenol	35,32	21,79	7,12	1573	1577
20	isoaromandendreno epóxido	36,52	1,94	1,97	1604	N
21	viridiflorol	35,92	1,08	0,14	1588	1592
22	α – copaen-11-ol	37,65	0,65	0,29	1534	1539
23	alloaromadendreno epóxido	38,36	1,82	0,45	1634	1639
24	ledeno oxido- (II)	42,39	1,52	0,36	1764	N
25	3- deoxy estradiol	48,96	0,21	0,38	1959	N
Diterpeno oxigenado						
26	fitol	53,53	0,31	0,30	2105	1948
Total			79,28	43,29		

IR^{CAL}: Índices de retenção, IR^{LIT}: Índice de retenção da literatura, N- Não encontrado na literatura. TE^{ret}: Tempo de retenção.

Tabela 2. Relação dos compostos identificados para o O.E da casca com o índice de retenção e suas respectivas concentrações no CG-EM e CG-DIC.

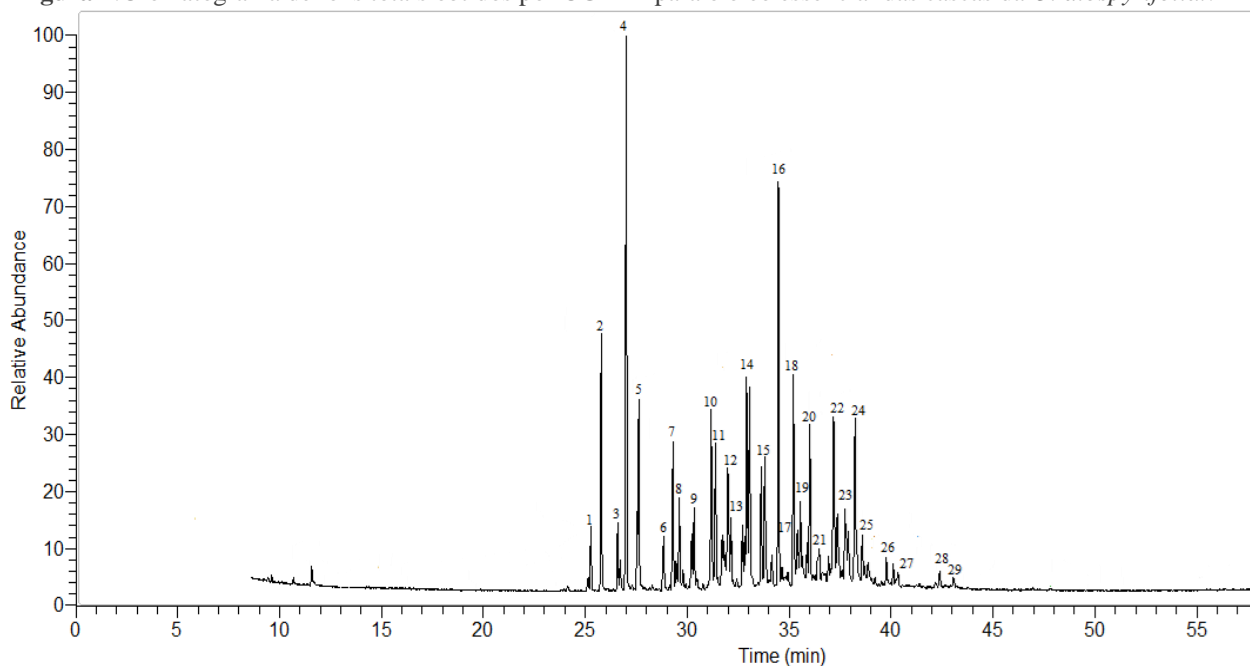
Indicação numérica	Constituintes	TE ^{ret}	% CG-EM	% CG-DIC	IR ^{CAL}	IR ^{LIT}
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos						
1	δ -elemeno	25,28	1,27	1,10	1330	1335
2	α - cubebeno	25,78	3,78	1,81	1341	1345
3	α - bulneseno	26,58	1,56	0,77	1360	1509
4	α - copaeno	27,00	8,01	2,79	1369	1374

5	β - elemeno	27,62	4,18	2,15	1384	1389
6	β - cariofileno	28,82	1,01	0,74	1412	1408
7	β -sesquiphellandreno	29,28	2,26	1,70	1423	N
8	<i>allo</i> -romadendreno	29,61	2,60	0,80	1431	1458
9	α - humuleno	30,33	2,62	5,77	1448	1452
10	τ muuruleno	31,17	3,40	4,40	1469	N
11	β - cubebeno	31,39	2,68	0,93	1482	1387
12	α - selineno	31,71	2,28	3,76	1482	1498
13	patchouleno	31,99	3,83	1,49	1489	1502
14	γ - cadineno	32,92	8,51	5,42	1512	1513
15	selina 3,7(11)-diene	33,82	4,64	1,27	1535	N
16	elixene	34,46	6,45	1,18	1551	N
Sesquiterpenos oxigenados						
17	veltonal	34,64	1,05	0,49	1555	1555
18	espatulenol	35,22	3,54	2,37	1570	1577
19	globulol	35,54	3,35	4,14	1578	1590
20	guaiol	36,02	3,27	2,44	1591	1600
21	widdrol	36,46	1,36	2,51	1602	1599
22	cubenol	37,17	6,46	0,92	1621	1645
23	τ - Cadinol	37,73	2,80	0,87	1636	1638
24	α - Cadinol	38,23	3,76	0,73	1650	1652
25	β guaiaene	38,59	1,23	0,53	1659	1502
26	juniper canfora	39,29	0,74	0,72	1678	N
27	ledene oxido	41,89	0,63	0,24	1750	
28	oxido <i>allo</i> aromadendreno	42,19	0,56	1,46	1758	N
29	(3a,10a-Dihydroxy-2,10-dimethyl-3,8-dioxo-3,3a,4,6a,7,8,9,10,10a,10b-decahydrobenzo[e]azulen-5-yl)methyl acetate #	43,06	0,40	1,23	1761	N

IR^{CAL}: Índices de retenção, IR^{LIT}: Índice de retenção da literatura, N- Não encontrado na literatura. TE^{ret}: Tempo de retenção.

Óleos essenciais vem sendo amplamente estudados em relação a suas propriedades antibacterianas e antifúngicas. Nos testes realizados frente as três bactérias testadas, os O.E. das cascas e folhas da *O. diospyrifolia* apresentou halos de inibição frente as duas bactérias gram-positivas *E. faecalis* e a *S. aureus* quando comparados ao padrão cloranfenicol. Os resultados são mostrados na Tabela 3. Alguns fatores como sazonalidade e tipo de extração podem intervir na composição química de óleos essenciais (SIANI *et al.*, 2000), entretanto, o óleo resultante da hidrodestilação evidenciou a ação antimicrobiana, corroborando assim com o potencial de uso dessa planta como agente antibacteriano nas bactérias gram-positivas testadas.

Figura 2. Cromatograma de íons totais obtidos por CG-EM para o óleo essencial das cascas da *O. diospyrifolia*.



Para os testes realizados com a bactérias *A. baumannii*, portadora do gene de resistência *bla_{oxa-23}* somente o óleo da casca apresentou CIM de 36000 µg/mL. Segundo a literatura, os óleos essenciais com CIM até 500 µg/mL possuem atividade antimicrobiana forte, com CIM entre 600 e 1600 µg/mL apresentam atividade moderada e CIM acima de 1600 µg/mL é considerado com atividade fraca (KUETE *et al.*, 2010; SARTORATTO *et al.*, 2004). Mesmo o óleo tendo apresentado uma atividade fraca frente a *A. baumannii* foram realizados os testes de

sinergismo entre os óleos e antibióticos pela técnica de difusão em meio sólido utilizando discos de papel filtro. Os resultados podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 3. Valores do halo de inibição (mm) nas três bactérias analisadas frente ao óleo da *O. diospyrifolia* (5 µL) contra ao padrão de cloranfenicol. (n=3)

Óleo <i>O. diospyrifolia</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Óleo da folha	(R)	23,28 ±6,14	14,67 ±3,16
Cloranfenicol	-	29,48	23,24
Óleo da casca	(R)	16,77 ±1,30	12,65 ±1,37
Cloranfenicol	-	28,66	24,83

(R) Não apresentou halo de inibição. ± desvio padrão.

Tabela 4. Associação óleo essencial da *O. diospyrifolia* e antibióticos e a bactéria *Acinetobacter baumannii*.

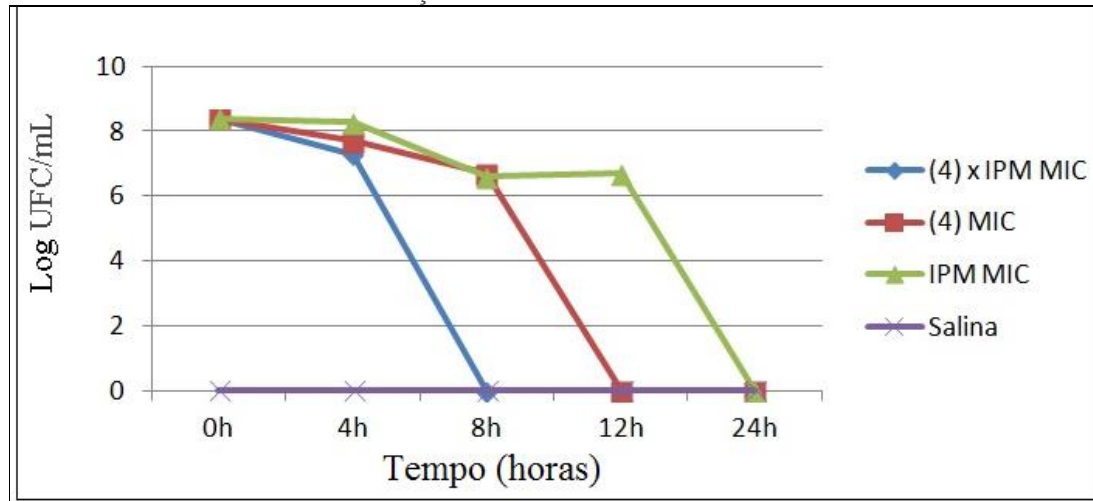
O.E. da <i>O. diospyrifolia</i>	Antibióticos				
	IPM	PPT	CIP	AMI	POLB
Folha	-	1 mm	-	1 mm	-
Casca	4 mm	-	-	-	3 mm

IPM: imipenem, PPT: piperacilina/tazobactam, CIP: ciprofloxacina, AMI: amicacina, POL: polimixina B.

Foi considerado a ocorrência de sinergismo entre o óleo da casca com os antibióticos imipenem (IPM) apresentando um halo de inibição de 4 mm e com polimixina B (POL) com 3 mm. Curvas de sobrevivência para as amostras dos óleos e os antibióticos IPM e POL foram construídas, na qual mostraram uma diminuição na contagem de células vivas ao longo do tempo quando foram tratadas com O.E. das folhas e cascas da *O. diospyrifolia*.

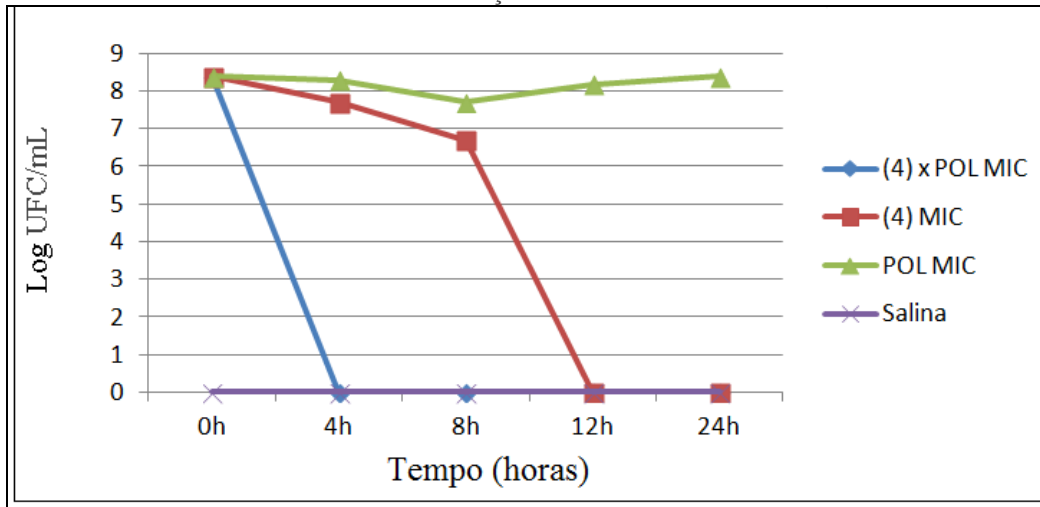
O óleo da casca juntamente com o IPM inibiu completamente a cepa resistente de *A. baumannii* (Figura 3). O sinergismo foi confirmado pelo método time-kill, com uma diminuição na contagem de células na faixa de 8 log₁₀ UFC/mL em um tempo de 8 horas. Embora o IPM por si só fosse eficiente em inibindo o crescimento bacteriano em 24 horas, sua combinação com o óleo essencial levou a uma redução para 16 horas. O óleo sozinho da *O. diospyrifolia* também mostrou um efeito de redução no crescimento da cepa *A. baumannii* em um tempo inferior ao IPM em 12 horas.

Figura 32. Curvas de sobrevivência adquiridas para a cepa bacteriana *A. baumannii* produtora de OXA₂₃. Estudo do efeito do óleo da casca da *O. diospyrifolia* e antibiótico imipenem até 24 horas. (4) x IPMMIC: Óleo essencial + Imipinem (antibiótico) em relação a bactéria *A.baumannii*. (4) MIC: Óleo essencial+ a bactéria. IPMMIC: Controle antibiótico + bactéria. Salina: solução salina.



O óleo essencial das cascas também apresentou bons resultados quando associado juntamente com o antibiótico POL quando observado na curva de sobrevivência (Figura 4). Diferentemente do óleo associado ao IPM, o sinergismo do óleo da casca quando associado ao antibiótico POL foi confirmado pelo método time-kill, com uma diminuição na contagem de células na faixa de 8 log₁₀ UFC/mL em um tempo de 4 horas. O óleo sozinho e o antibiótico POL também apresentaram uma redução na contagem das células vivas em 12 e 24 horas, respectivamente.

Figura 43. Curvas de sobrevivência adquiridas para a cepa bacteriana *A. baumannii* produtora de OXA₂₃. Estudo do efeito do óleo da casca da *O. diospyrifolia* e antibiótico polimixina B até 24 horas. (4) x POLMIC: Óleo essencial +polimixina B (antibiótico) em relação a bactéria *A.baumannii*. (4) MIC: Óleo essencial+ bactéria. POLMIC: Controle antibiótico + bactéria. Salina: solução salina.



O sinergismo que ocorre entre o O.E. e antibiótico pode ter uma relação de interação do O.E. com a membrana do microrganismo e por este motivo permitir que o antibiótico tenha uma maior interação com o agente bacteriano e sua ação seja mais eficaz (D'ARRIGO *et al.*,2010). Em um trabalho realizado por HARRIS e colaboradores, (2003) reporta que devido à natureza lipídica dos compostos terpênicos que estão presentes no óleo, resulta em um transporte melhor do antibiótico para dentro da célula bacteriana, alterando a permeabilidade da membrana citoplasmática. A combinação de antibióticos com extratos vegetais e óleos essenciais pode ser uma base significativa para o desenvolvimento de uma nova abordagem em agentes modificadores de resistência, devido ao baixo risco de aumentar a resistência bacteriana, uma vez que a necessidade de seleção de antibióticos é reduzida (STEFANOVIC, *et al.*, 2012). É possível melhorar a eficiência de medicamentos tendo em vista a associação com excipientes tais como os óleos essenciais diminuindo até mesmo a dosagem de antibióticos tais como IPM e POLB.

5 CONCLUSÃO

O perfil cromatográfico para o O.E da *O. diospyrifolia* apresentou em sua composição química desde monoterpenos a sesquiterpenos oxigenados para as folhas e a ocorrência de compostos sesquiterpenos para casca. Quando observamos os testes antimicrobianos frente às bactérias gram-positivas e negativas o O.E apresentou efeito somente para as bactérias gram-positivas *E. faecalis* e *S. aureus*, resultado este que reforça o relato de que micro-organismos

gram-negativos apresentam uma resistência maior perante óleos essenciais devido as suas estruturas celulares. A realização do CIM perante a bactéria *A. baumannii* apresentou uma fraca atividade com valor de 36000 µg/mL. O teste de sinergismo para o óleo da casca se mostrou eficaz quanto ao potencial de redução de crescimento bacteriano em associação com antibióticos polimixina B e imipenem, resultados como estes corroboram para testes futuros como a realização dos ensaios “*checkboard*” para verificação das melhores combinações de concentrações entre os agentes e cálculo do FIC (Fractional Inhibitory Concentration) e a toxicidade. Através do sinergismo foi possível a redução de até 8 horas no crescimento bacteriano com a associação entre o óleo e o antibiótico imipenem e de 4 horas para polimixina B e óleo essencial.

REFERÊNCIAS

- Abdelwahab, S.I.; Mariod, A.A.; Taha, M.M.E.; Zaman, F.Q.; Abdelmageed, A.H.A.; Khamis, S.; Sivasothy, Y.; Awang, K. Chemical composition and antioxidant properties of the essential oil of *Cinnamomum altissimum* Kosterm. (Lauraceae). *Arabian Journal of Chemistry*. (2017) 10, 131-135
- Dos Santos, L. B.; Souza, J. K.; Papassoni, B.; Borges, D. G. L.; Junior, G. A. D.; Souza, J. M. E.; Carollo, C. A.; Borges, F. A. Efficacy of extracts from plants of the Brazilian Pantanal against *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus. *Revista brasileira de Parasitologia veterinária*, v.22, p.532-538, 2013.
- D'arrigo, M., Ginestra, G., Mandalari, G., Furneri, P. M., & Bisignano, G. Synergism and postantibiotic effect of tobramycin and *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Phytomedicine*, v.17, n.5, p.317-322, 2010.
- O.D. Stefanovic, D.D. Stanojevic and L.R. Comic, Synergistic antibacterial activity of *salvia officinalis* and *cichorium intybus* extracts and antibiotics. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 69, 457–463 (2012).
- Fankam, A. G.; Kuete, V.; Voukeng, I. K.; Kuate, J. R.; Pages, J. M. Antibacterial activities of selected Cameroonian spices and their synergistic effects with antibiotics against multidrug-resistant phenotypes. *BMC Complement Altern Med*, v.11, p. 104, 2011.
- Gonçalves, R.A.; Pinheiro, A.B.; Oliveira, M.A.; Nascimento, R.T.; Rosalem, P.F.; Garcia, V.L. Anatomical characters and chemical profile of leaves of three species in Lauraceae family. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 28 (2018) 1-8.
- Gontijo, D.C.; Brandão, G.C.; Gontijo, P.C.; Oliveira, A.B.; Diaz, M.A.N.; Fietto, L.G.; Leite, J.P.V. Identification of phenolic compounds and biologically related activities from *Ocotea odorifera* aqueous extract leaves. *Food Chemistry*. 230 (2017) 618-626.
- Habbal, O.; EL-Hag, A. H.; Al-Mahrooqi, Z.; Al-Hashmi, N.; Al-Bimani, Z.; Al-Balushi, M. S.; Al-Jabri, A. A. Antibacterial activity of *Lawsonia inermis* Linn (Henna) against *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Pac J Trop Biomed*, v.1, n.3, p.173-176, 2011.
- Harris, R. Synergism in the essential oil world. *The International Journal of Aromatherapy*, v.12, p.179-186, 2003.
- Kuete, V.; Poumale, H.M.; Guedem, A.N.; Shino, Y.; Randrianasolo, R.; Ngadjui, B.T. Evaluation of *Antiaris africana* methanol extract and compounds for antioxidant and antitumor activities. *Pharmaceutical Biology*, v. 76, 536-542, 2010.
- Knezevic, P.; Aleksic, V.; Simin, N.; Svircev, E.; Petrovic, A.; Mimicadukic, N. Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* essential oil and their interactions with conventional antimicrobial agents against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.178, p.125-136, 2016.
- Lorenzi, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. 2ª ed. Nova Odessa, Plantarum, 1998.
- Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – M2-A8 Vol. 23 No 1 – 8ª Edição, adaptação de NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003
- Clinical and Laboratory Standards Institute Standards Development Policies and Process. This document is effective as of October 01, 2013.
- Santos, S. O.; Alves, M. Flora da Usina São José, Igarassu, Pernambuco: Lauraceae. **Rodriguésia**, v.63, n.3, p.689-703, 2012.

Sartoratto, A.; Machado, A. L. M.; Delarmelina, C.; Figueira, G. M.; Duarte, M. C. T.; Rehder, V.L .G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 35, p. 275- 280, 2004.

Siani, A.C.; Sampaio, A.L.F.; Souza, M.C.; Henriques, M.G.M.O.; Ramos, M.F.S. Óleos Essenciais. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 3, n.16, p.38-43, 2000.

Silva, M.T.N.; Ushimaru, P.I.; Barbosa, L.N.; Cunha, M.L.R.S.; Fernandes Junior, A. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, v.11, n.3, p.257-262, 2009

Trajano, V. N.; Lima, E. O.; Souza, E. L.; Travassos, A. E. R. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.29, n.3, p.542-545, 2009.

moraes, P.L.R. SINOPSE DAS LAURÁCEAS NOS ESTADOS DE GOIÁS E TOCANTINS, BRASIL. *Biota Neotropica* v5 (n2) – <http://www.biotaneotropica.org.br/v5n2/pt/abstract?taxonomic-review+bn00905022005>. (2005).