



## USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS CONTRA *Cutibacterium acnes*

LUCAS PRADO LEITE; JONAS CONTIERO; MARIA OLIMPIA PEREIRA SEREIA

### RESUMO

Desde a pandemia de SARS-COV II, a comunidade de saúde internacional tem se manifestado para alertar a problemática de novas epidemias e pandemias do mundo, juntamente dos vírus, as superbactérias têm ganhado destaque e atenção tanto para prever sua adaptação, quanto para o desenvolvimento de meios para combatê-las, visto que os antibióticos têm perdido sua eficácia, pela adaptação para resistência adquirida pelas bactérias. Nesse cenário, temos a *Cutibacterium acnes*, uma bactéria Gram-positiva, comensal da pele humana, que se comporta, em situações específicas, como um patógeno oportunista. Responsável por mais de 60% das infecções dérmicas, além de ser encontrada, também, em infecções relacionadas a próteses e implantes cirúrgicos, essa bactéria tem demonstrado, ao longo dos anos, um aumento em resistência aos antibióticos e tratamentos convencionais, aumentando a urgência de métodos alternativos para controlar suas infecções. Além disso, a cepa bacteriana, capaz de produzir biofilme, dificulta o sucesso dos compostos para seu controle e aumenta sua taxa de infecção quando bem aderida a superfície, explicando sua alta infecção em próteses, sendo necessário buscar formas de ou ultrapassar o biofilme bacteriano, ou degradá-lo. Para tal, os óleos essenciais se mostram como uma alternativa. Extraídos de plantas, esses compostos voláteis, possuem diversas propriedades a serem estudadas, desde auxiliarem como anti-inflamatórios, até como compostos antimicrobianos. Alguns óleos que têm demonstrado uma alta capacidade antimicrobiana são os óleos de orégano, canela e melaleuca. Dessa forma, o estudo em questão visa estudar o potencial antimicrobiano desses óleos contra a cepa *Cutibacterium acnes*, bem como seus efeitos no biofilme.

**Palavras-chave:** Antimicrobiano; óleo essencial; Acnes vulgaris; Biofilme

### 1 INTRODUÇÃO

Com o passar dos anos a adaptação das bactérias contaminantes e patogênicas têm aumentado frente os métodos de tratamento atual, sendo necessário um constante investimento em novas formas de prevenção e tratamento. Nesse cenário, o biofilme bacteriano, um componente extracelular secretado por diversas bactérias, é um dos principais desafios a ser transpassado, pois confere maior resistência às bactérias, além de facilitar sua agregação no ambiente, permitindo seu crescimento rápido, consequentemente, a contaminação onde é produzido (Saadati; *et al*, 2022). A espécie bacteriana que tem apresentado um aumento significativo em sua taxa de infecção e alto grau de resistência a antibióticos, é a *Cutibacterium* (Fournière; *et al*, 2020). Essas espécie habita como comensal da pele humana, fazendo parte de sua microbiota, contudo, pode agir como patógeno oportunista, sendo a principal colônia bacteriana encontrada em infecções dérmicas e mais recentemente, foi descoberta sua presença em infecções em implantes cirúrgicos relacionados a articulações, silicone, e implantes

cardíacos(Abbott; *et al*, 2020; Coenye; Spittaels; Achermann; 2020).

Óleos essenciais são definidos como: óleos voláteis ou essências produzidas por plantas e caracterizados por sua resistência à hidrólise (López; *et al*, 2017). São, em resumo, uma mistura complexa de voláteis, apresentando em sua composição terpenos, aldeídos, álcoois e ésteres, que apresentam como função atrair polinizadores de plantas e como componente antifúngico e antibacteriano. Já no uso por seres humanos, encontra-se sendo aplicado para fins antioxidantes, anti séptico, anti inflamatório e na preservação de alimentos (López; *et al*, 2017; Santos; Piccoli; Tebaldi, 2017). Apesar de inicialmente serem utilizados para confecção de perfumes e como conservante de alimento, sua alta eficiência contra bactérias resistentes a antibióticos vem aumentando o interesse para substituírem os atuais compostos sintéticos, que já não se mostram mais tão eficientes, como por exemplo a *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina, (Man; *et al*, 2019).

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Cultivo de *Cutibacterium acnes*

#### 2.1.1 Reativação da Bactéria Liofilizada

A cepa de *Cutibacterium acnes* ATCC 6919 obtida pela Fundação Andrea Tosello foi reativada em meio líquido RCM e armazenada em jarra de anaerobiose a 37°C por 72 horas.

#### 2.1.2 Meio de Cultura

A bactéria *Cutibacterium acnes* foi inoculada em placa de Petri contendo meio sólido RCM, cuja formulação consiste em (g/L): extrato de carne - 10, extrato de levedura - 3,0, triptona - 10, glicose - 10, cloreto de sódio 5,0, cisteína (cloridrato) - 0,50, amido solúvel - 1,0, acetato de sódio 3,0, ágar bacteriológico - 0,5. O pH foi ajustado para 7,1 a 25°C. As placas foram armazenadas em jarra de anaerobiose a 37°C por 7 dias (Borrel, *et al*. 2019).

### 2.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais utilizados serão: óleo de orégano(*Origanum vulgare*), óleo de canela(*Cinnamomum cassia*) e óleo de melaleuca(*Melaleuca alternifolia*). Os óleos foram adquiridos da Ferquima Indústrias e Comércio Ltda.

#### 2.2.1 Composição dos óleos essenciais

Óleo de orégano(*Origanum vulgare*): Beta-cariofileno 3,24%, Carvacrol 72,15%, Gama-terpineno 4,61%, Linalol 2,74%, Para-cimeno 4,88%, Timol 2,48%. Óleo de canela(*Cinnamomum cassia*): Álcool cinâmico 0,24%, Aldeído cinâmico 83,23%, Benzaldeído 0,85%, Cumarina 0,98%.

### 2.3 Determinação da concentração inibitória mínima

O método de avaliação será por contagem de colônias viáveis utilizando placas de Petri e meio de cultivo com ágar. Para os óleos essenciais será utilizado concentração por volume (v/v). A bactéria foi crescida por 24 horas em frascos Erlenmeyers com meio líquido contendo diferentes concentrações de óleo essencial, sendo elas: 1%, 0,5%, 0,25%, 0,125%, 0,06%, e foi utilizado um frasco sem adição de composto como controle negativo para comparação. Após esse período, os frascos foram macro diluídos em 10<sup>-5</sup> e inoculados 20µl em placas de Petri e incubados por 24 horas, passado o tempo foi realizada a contagem das colônias. O experimento foi conduzido em triplicata

### 2.4 Determinação da inibição de biofilme

Foi colocado em microplaca de 96 poços 400µl de solução contendo as concentrações de óleos essenciais em 2X suas concentrações inibitórias, e foi transferido 200 µl para a fileira de baixo, contendo 200 µl de meio RCM, dessa forma reduzindo a concentração pela metade sucessivamente. Foi, então, adicionado 10µl de inóculo bacteriano  $1 \times 10^8$  UFC/mL completando nos poços. uma fileira contendo meio sem adição de compostos foi utilizada para controle negativo. A microplaca será vedada com papel filme e colocada para crescer a 37°C sem agitação por 24 horas para permitir a adesão do biofilme na parede dos poços. Após esse período, os poços foram lavados 3 vezes utilizando água estéril para desprendimento de células planctônicas, feita a lavagem, a placa foi colocada para secar em estufa a 50°C por 45 minutos. Os poços foram completados com 200 µl de solução com cristal violeta 1% (m/v) e incubados a temperatura ambiente por 15 minutos. Para retirar qualquer resíduo que não foi aderido, foi realizada mais 3 lavagens utilizando água estéril, prosseguindo pela retirada do biofilme da parede dos poços utilizando 200 µl de ácido acético 30%. Por fim, 100 µl serão retirados dos poços e colocados em cubetas para medição da densidade óptica em 590 nm( OD590nm). A porcentagem de inibição foi realizada utilizando a seguinte fórmula e foi utilizada em comparação com o controle negativo(Bazargani; Rohloff, 2016). O experimento foi conduzido em triplicata e realizado em três eventos independentes.

$$\text{Inibição do biofilme} = \frac{DO \text{ controle negativo} - DO \text{ experimental} \times 100}{DO \text{ controle negativo}}$$

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Determinação da concentração inibitória mínima

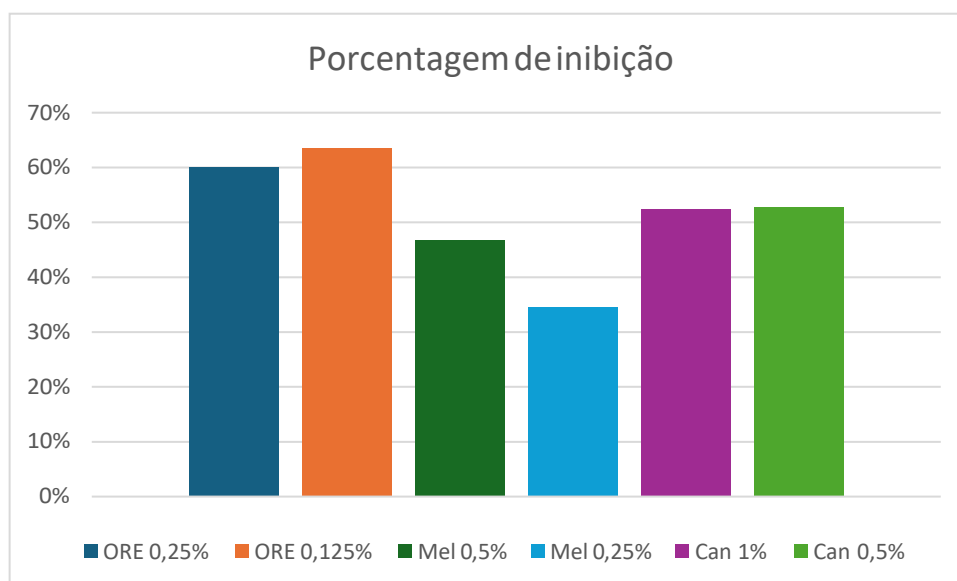
Os resultados obtidos para a concentração inibitória mínima dos óleos de orégano, canela e melaleuca, foram respectivamente, 0,05%, 0,5% e 0,2%. Apesar de todos os óleos testados terem efeito na membrana celular para realizar sua inibição (Chouhan; Sharma; Guleria, 2017), eles possuem diferentes concentrações inibitórias, sendo o óleo de orégano 10X mais eficiente do que o óleo de canela. Isso se deve ao fato de os óleos essenciais possuírem diferentes composições químicas, sendo o carvacrol, o principal agente de inibição e o mais presente no óleo de orégano, representando 72% de sua composição.

#### 3.2 Determinação da inibição de biofilme

O teste de biofilme foi performed utilizando o dobro das concentrações inibitórias mínimas e as concentrações inibitórias propriamente ditas. Desta forma foram testadas, para cada óleo, as seguintes concentrações: Óleo de orégano: 0,25% e 0,125%; Óleo de canela: 1% e 0,5%; Óleo de melaleuca: 0,5% e 0,25%.

Os resultados obtidos foram de 60%, 50% e 35% de inibição para óleo de orégano, canela e melaleuca, respectivamente, mostrado no gráfico abaixo.

**Figura 1:** Gráfico de inibição de biofilme



**Fonte:** Gerado pelo autor.

O teste realizado evidencia a diminuição efetiva no biofilme antes de sua síntese, logo, a diminuição é causada, provavelmente pela morte celular da bactéria e não pela degradação do biofilme. Sendo assim, vemos que os diferentes resultados obtidos pelos óleos mostram, também, um tempo de ação diferente para cada óleo. Para evidenciar se há degradação de biofilme, um teste com biofilme já confeccionado é necessário para elucidar se os óleos essenciais possuem tal capacidade.

### 4 CONCLUSÃO

Os óleos essenciais se mostraram promissores como alternativas para substituir os antibióticos atuais contra *Cutibacterium acnes*, demonstrando concentrações baixas para

inibição de colônias e com capacidade de inibir a estrutura de biofilme dela. Entretanto, para consolidação como uma alternativa viável como um tratamento para infecções dérmicas, testes in vivo são necessários bem como testar o potencial dos óleos essenciais em conjunto com outras substâncias, visando melhorar sua eficiência e diminuir a quantidade necessária para obtenção de um tratamento eficaz.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, C., GROUT, E., MORRIS, T., & BROWN, H. L. Cutibacterium acnes biofilm forming clinical isolates modify the formation and structure of Staphylococcus aureus biofilms, increasing their susceptibility to antibiotics. **Anaerobe**, 76, 102580, 2022.
- ADU, S. A., NAUGHTON, P. J., MARCHANT, R., & BANAT, I. M. Microbial biosurfactants in cosmetic and personal skincare pharmaceutical formulations. **Pharmaceutics**, 12(11), 1099, 2020.
- AK, M. A. comprehensive review of acne vulgaris. **J. Clin. Pharm**, 1(1), 17-45, 2019.
- BALOUIRI, M., SADIKI, M., & IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of pharmaceutical analysis**, 6(2), 71-79, 2016.
- BAZARGANI, M. M., & ROHLOFF, J. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against Staphylococcus aureus and Escherichia coli biofilms. **Food control**, 61, 156-164, 2016.
- BNDES (Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social) 2011, [https://www.bndes.gov.br/arquivos/chamada\\_publica\\_FEPprospec0311\\_Quimicos\\_Relat4\\_tecnologias.pdf](https://www.bndes.gov.br/arquivos/chamada_publica_FEPprospec0311_Quimicos_Relat4_tecnologias.pdf). Acesso em: 20/04/2022.
- BOJAR, R. A., & HOLLAND, K. T. Acne and Propionibacterium acnes. **Clinics in dermatology**, 22(5), 375-379, 2004.
- BORREL, V., THOMAS, P., CATOVIC, C., RACINE, P. J., KONTO-GHIOGHI, Y., LEFEUVRE, L., ... & FEUILLOLEY, M. G. Acne and stress: impact of catecholamines on Cutibacterium acnes. **Frontiers in medicine**, 155, 2019.
- CAVALLO, I., SIVORI, F., TRUGLIO, M., DE MAIO, F., LUCANTONI, F., CARDINALI, G., ... & DI DOMENICO, E. G. Skin dysbiosis and Cutibacterium acnes biofilm in inflammatory acne lesions of adolescents. **Scientific Reports**, 12(1), 21104, 2022.
- CLEMENTE, I., AZNAR, M., SILVA, F., & NERÍN, C. Antimicrobial properties and mode of action of mustard and cinnamon essential oils and their combination against foodborne bacteria. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 36, 26-33, 2016.
- COENYE, T., SPITTAELS, K. J., & ACHERMANN, Y. The role of biofilm formation in the pathogenesis and antimicrobial susceptibility of Cutibacterium acnes. **Biofilm**, 4, 100063, 2022.
- DRÉNO, B., PÉCASTAINGS, S., CORVEC, S., VERALDI, S., KHAMMARI, A., & ROQUES, C. Cutibacterium acnes (Propionibacterium acnes) and acne vulgaris: a brief look at the latest updates. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, 32, 5-14, 2018.
- FOURNIÈRE, M., LATIRE, T., SOUAK, D., FEUILLOLEY, M. G., & BEDOUX, G. Staphylococcus epidermidis and Cutibacterium acnes: two major sentinels of skin microbiota and the influence of cosmetics. **Microorganisms**, 8(11), 1752, 2020.

GARCIA, D., MAYFIELD, C. K., LEONG, J., DECKEY, D. G., ZEGA, A., GLASSER, J.,  
...  
& BORN, C. Early adherence and biofilm formation of *Cutibacterium acnes* (formerly  
*Propionibacterium acnes*) on spinal implant materials. **The Spine Journal**, 20(6), 981-987,  
2020.

HAMMER, K. A. Treatment of acne with tea tree oil (*melaleuca*) products: a review of efficacy,  
tolerability and potential modes of action. **International journal of antimicrobial agents**,  
45(2), 106-110, 2015.

KUEHNAST, T., CAKAR, F., WEINHÄUPL, T., PILZ, A., SELAK, S., SCHMIDT, M. A.,  
...  
& SCHILD, S. Comparative analyses of biofilm formation among different *Cutibacterium*  
*acnes* isolates. **International Journal of Medical Microbiology**, 308(8), 1027-1035, 2018.

LEYVA-LÓPEZ, N., GUTIÉRREZ-GRIJALVA, E. P., VAZQUEZ-OLIVO, G., &  
HEREDIA, J. B. Essential oils of oregano: Biological activity beyond their antimicrobial  
properties. **Molecules**, 22(6), 989, 2017.

MAN, A., SANTACROCE, L., IACOB, R., MARE, A., & MAN, L. Antimicrobial activity of  
six essential oils against a group of human pathogens: A comparative study. **Pathogens**, 8(1),  
15, 2019.

MAYSLICH, C., GRANGE, P. A., & DUPIN, N. *Cutibacterium acnes* as an opportunistic  
pathogen: An update of its virulence-associated factors. **Microorganisms**, 9(2), 303, 2021.

PLATSIDAKI, E., & DESSINIOTI, C. Recent advances in understanding *Propionibacterium acnes* (*Cutibacterium acnes*) in acne. **F1000Research**, 7, 2018.

SAADATI, F., SHAHRYARI, S., SANI, N. M., FARAJZADEH, D., ZAHIRI, H. S., VALI, H. , & NOGHABI, K. A. Effect of MA01 rhamnolipid on cell viability and expression of quorum-sensing (QS) genes involved in biofilm formation by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Scientific Reports**, 12(1), 14833, 2022.

SANTOS, C. D. S., PICCOLI, R. H., & TEBALDI, V. M. R. Antimicrobial activity of the essential oils and isolated compounds on the hospital-borne and foodborne pathogens. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 76, 2017.

TUNNEY, M. M., PATRICK, S., CURRAN, M. D., RAMAGE, G., HANNA, D., NIXON, J. R., ... & ANDERSON, N. Detection of prosthetic hip infection at revision arthroplasty by immunofluorescence microscopy and PCR amplification of the bacterial 16S rRNA gene. **Journal of clinical microbiology**, 37(10), 3281-3290, 1999.