

Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. e tintura de própolis frente à bactéria causadora da acne *Propionibacterium acnes*

BARBOSA, V.¹; SCHEIFFER, G.F.C.¹; CARDOZO, A.G.L.¹; PIETRUCHINSKI, E.¹; SANTOS, C.Z.¹; SILVEIRA, D.²; BERTOCCO, A.R.P.²

¹ Centro de Ensino Superior dos Campos Gerais, Departamento de Farmácia, Av. Carlos Cavalcanti 8000, CEP 84030-000, Ponta Grossa – PR *vanessabarbosa273@bol.com.br; ²Universidade Estadual de Ponta Grossa, Departamento de Farmácia, Av. Carlos Cavalcanti 4748, CEP 84.030-900, Ponta Grossa- PR.

RESUMO: A acne é uma doença de pele extremamente comum. Sua patogênese é multifatorial, incluindo hiperqueratinização folicular, hiperplasia sebácea, hipercolonização bacteriana. A *Propionibacterium acnes* possui um papel relevante na resposta inflamatória da patogênese da acne. Os antibióticos representam uma das classes de medicamentos utilizadas no tratamento da acne. No entanto, as reações adversas causadas por esses fármacos tornam o tratamento desagradável, além de casos relatados de resistência bacteriana. Por esse motivo, o uso de produtos naturais tem sido destaque na área de dermatologia. O presente trabalho visou avaliar “*in vitro*” os possíveis efeitos antimicrobianos do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* e da tintura de própolis sobre cepa de *Propionibacterium acnes* (ATCC 1969). O óleo essencial foi extraído pela técnica de hidrodestilação e obteve-se a tintura de própolis por maceração. O ensaio antimicrobiano foi realizado pela técnica da diluição em tubos. O óleo foi testado em diferentes concentrações, variando de 16% a 0,0625% e a tintura de 10% a 0,072312%. Pode-se verificar que o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. não apresentou atividade antibacteriana contra a cepa de *Propionibacterium acnes*. A tintura de própolis teve ação em várias concentrações, sendo a concentração inibitória mínima de 0,625%.

Palavras-chaves: Acne, *Propionibacterium acnes*, *Rosmarinus officinalis*, tintura de própolis.

ABSTRACT: Evaluation of the antibacterial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. and propolis tincture against the bacterium that causes acne: *Propionibacterium acnes*. Acne is an extremely common skin disease. The pathogenesis of acne is multifactorial, including follicular hyperkeratinization, sebaceous hyperplasia and hypercolonization of bacteria. The *Propionibacterium acnes* has an important role in the inflammatory response of the pathogenesis of acne. Antibiotics are one of the drugs used in the treatment of acne. However, the adverse reactions caused by these drugs turn the treatment unpleasant, besides the existence of cases of bacterial resistance. For this reason, the use of natural products has been prominent in the dermatology area. This work intended to perform an *in vitro* evaluation of the possible antimicrobial effects of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* and propolis tincture on the *Propionibacterium acnes* (ATCC 1969) strain. The essential oil was extracted by hydrodistillation, and the propolis tincture was obtained by maceration. The antimicrobial test was conducted by the tube dilution technique. The oil was tested in different concentrations varying between 16% and 0.0625%, and the tincture, between 10% and 0.072312%. We verified that the essential oil of *Rosmarinus officinalis* has no effects against the *Propionibacterium acnes* strain. The propolis tincture showed some action in several concentrations, being the minimal inhibitory concentration: 0.625%.

Keywords: Acne, *Propionibacterium acnes*, *Rosmarinus officinalis*, propolis tincture.

INTRODUÇÃO

A acne é a mais comum dentre as doenças de pele. Há muitos anos a antibioticoterapia tem

sido uma forma de tratamento. Porém, as reações adversas causadas pelos medicamentos acabam

tornando o tratamento desagradável, além de casos relatados de diminuição da sensibilidade aos antibióticos (Park et al., 2004; Chomnawang et al., 2005). Os fatores que acarretam a formação da acne são: hiperqueratinização folicular, hiperplasia sebácea, hipercolonização bacteriana, bem como reações imunes e inflamação (Muizzuddin et al., 2008).

O uso de produtos naturais em dermatologia está se tornando cada vez mais comum devido à crescente resistência de bactérias aos antibióticos sintéticos. Os princípios ativos das plantas medicinais tornam-se nova opção como antissépticos e antimicrobianos (Weckesser et al., 2007).

Dentre os produtos naturais utilizados por pacientes em tratamento dermatológico, destacam-se os óleos essenciais, os quais apresentam como benefício o fato de não oferecerem ajuda apenas com os sintomas físicos, mas também por auxiliarem na melhora da qualidade de vida, auto-estima e bem estar geral dos portadores de afecções cutâneas, tais como a acne vulgar (Stevensen, 1998).

A espécie *Rosmarinus officinalis* L., conhecida popularmente como alecrim, tornou-se alvo de muitos estudos por possuir propriedades carminativas, espasmolíticas, antioxidantes e, principalmente, antimicrobianas, as quais podem ser atribuídas aos compostos majoritários presentes em seu óleo essencial: α -pineno, 1,8-cineol, cânfora e β -mirceno (Porte & Godoy, 2001; Newall et al., 2002).

Outro produto natural que se destaca em dermatologia é a própolis, uma resina natural produzida pelas abelhas melíferas utilizada popularmente como anti-inflamatório e cicatrizante em ferimentos (Pereira et al., 2002).

A composição química da própolis depende da flora de cada região visitada pelas abelhas e com o período de coleta da resina. Pode apresentar flavonóides (flavonas, flavonóis e flavononas), terpenóides, ácidos aromáticos, esteróides, proteínas e muitos outros grupamentos orgânicos. As funções terapêuticas podem ocorrer através do sinergismo destes compostos químicos (Marcucci, 1996; Menezes, 2005; Lustosa et al., 2008).

A própolis é capaz de desempenhar inúmeras funções terapêuticas devido à sua composição química. As funções que motivaram o desenvolvimento deste trabalho foram a anti-inflamatória e a antibacteriana.

Segundo Borrelli e colaboradores (2002), a atividade anti-inflamatória pode estar relacionada com a presença de flavonóides, destacando-se a galangina. Este flavonóide possui atividade inibitória contra a ciclooxigenase (COX) e lipooxigenase. A propriedade antibacteriana da própolis também esta relacionada com a presença de flavonona

pinocembrina, ao flavonol galagina e ao éster feniletil do ácido caféico, o mecanismo de ação se dá através da inibição do RNA-polimerase bacteriano. Entretanto, compostos como os flavonóides, o ácido caféico, ácido benzóico, ácido cinâmico, parecem agir na membrana ou parede celular do microorganismo, causando danos funcionais e estruturais (Uzel et al., 2005; Scazzocchio et al., 2006).

A *Propionibacterium acnes* apresenta-se como um bacilo Gram positivo, anaeróbio e está envolvida na resposta inflamatória da patogênese da acne, o que estimulou o interesse deste trabalho em analisar os possíveis efeitos antibacterianos do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* e anti-inflamatórios da tintura de própolis sobre a resposta inflamatória, reação especificamente causada pela *Propionibacterium acnes* (TSAI et al., 2010).

MATERIAL E MÉTODO

Obtenção do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L

As partes aéreas (folhas) de *Rosmarinus officinalis* L foram coletadas na primavera, em horto doméstico, posteriormente, dessecadas a temperatura ambiente e em seguida em estufa aquecida a 35°C até o peso tornar-se constante, para a obtenção da massa seca. O material vegetal foi identificado pelo Herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob número 18040.

A extração do óleo essencial foi realizada por meio da técnica de hidrodestilação, utilizando o aparelho de Clevenger, por um período de duas horas. Decorrido o tempo da extração, foi realizada a leitura do volume do óleo essencial diretamente na escala volumétrica do tubo separador do aparelho de Clevenger e, posteriormente, foi calculado o rendimento pela equação $T\%(v/p) = \text{volume da essência (mL)} \times 100(\text{g})/\text{quantidade do vegetal em gramas}$.

O óleo resultante foi coletado e acondicionado em frasco de vidro âmbar sendo armazenado sob refrigeração até o momento do uso.

Obtenção da tintura de própolis

A resina da própolis recolhida (região de Ponta Grossa-PR) foi triturada para o processo de maceração. Posteriormente, o triturado foi pesado em 20g e adicionado álcool de cereais em quantidade suficiente para 100 ml. Este procedimento foi realizado de acordo com a 4ª edição da Farmacopéia Brasileira, que padroniza a obtenção de tinturas mãe em concentração de 20%.

O processo de extração durou 20 dias. Após, a amostra foi filtrada para a eliminação de

resíduos e acondicionada em recipiente de vidro âmbar.

Ensaio microbiológicos

Em frasco estéril foi adicionado 3,2 mL do óleo essencial, 0,08 mL de Tween 80 e 10 mL de água destilada estéril, obtendo-se uma concentração final de 32% do óleo essencial.

Foi selecionada para o presente estudo, a cepa padrão de *P. acnes* (ATCC®1969) adquirida da Bioscan® Produtos para Laboratório Ltda, e armazenada conforme orientação do fabricante.

O meio utilizado nos ensaios biológicos foi o caldo de tioglicolato sem indicador (Newprov® Produtos para Laboratório Ltda).

A cepa de *P. acnes* foi ativada diretamente na placa de Agar sangue, seguindo as orientações do fabricante: foi distribuído lentamente 20 mL de água estéril sobre toda a superfície absorvente do gerador de atmosfera Anaerobac®, e, após este procedimento, foi incluída a fita indicadora, que, através da mudança de cor (azul para branco) confirmava o ambiente anaeróbico. Com a jarra para anaerobiose fechada, incubou-se a 37°C por 48 horas.

Para controle da atividade antimicrobiana foi utilizado como padrão o antibiótico Clindamicina 2% (solubilizada em água) obtida em Farmácia de Manipulação de Ponta Grossa / Paraná.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) – Técnica de Macrodiluição.

A determinação da CIM do produto estudado frente à *P. acnes*, foi realizada através da técnica de macrodiluição conforme padronizado pelo CLSI (Clinical Laboratory and Standards Institute).

Para o óleo essencial foi preparada uma série com 11 tubos de ensaio contendo 3 mL do caldo de tioglicolato em uma estante de ensaio. Em seguida, foi distribuído 3 mL da solução de óleo essencial a 32% no primeiro tubo, obtendo-se a concentração de 16%; a partir dessa concentração foram feitas as diluições seriadas à razão 2 dos tubos 2 a 9, obtendo-se as concentrações de 8% a 0,0625%. O mesmo procedimento foi realizado com a tintura de própolis a 20% obtendo concentrações de 10% a 0,072312%.

Foram reservados dois tubos, sendo um para o antibiótico Clindamicina 2% que foi utilizado como controle positivo, e outro para controle do crescimento da bactéria (viabilidade da cepa), sem adição de qualquer substância, contendo somente o meio de cultura. Em seguida, adicionou-se a cada tubo 50 µl do inóculo (correspondente a 750.000 UFC). Foram adicionadas 3 gotas de vaselina líquida estéril em cada tubo com o objetivo de vedar os tubos, uma vez que a bactéria possui características

anaeróbicas.

Os ensaios foram realizados em triplicata e incubados a 37°C durante 48 horas. Após o tempo de incubação foi realizado o repique em ágar sangue e novamente incubado a 37°C durante 48 horas em meio anaeróbico.

A leitura foi realizada visualmente, pela ausência ou presença de crescimento de *P. acnes* através de formação de colônias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento do óleo essencial extraído por hidrodestilação das partes aéreas de *R. officinalis* L. para a análise microbiológica foi de 3,66%, condizente com o que foi especificado por Marchiori (2004).

Os resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo em estudo podem ser observados na Tabela 1.

Pode-se verificar que o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. não apresentou atividade antibacteriana contra a cepa de *P. acnes*. Esses resultados não foram compatíveis com os estudos realizados por Weckesser et al., (2006) que encontrou atividade antibacteriana frente a cepa da bactéria em teste.

O óleo essencial pesquisado neste trabalho pode ter composição diferente do extrato estudado no artigo de Weckesser et al., (2006). Essa diferença pode ser explicada pela técnica de extração empregada por eles, que foi a extração supercrítica com CO₂. Sendo que o produto obtido por essa técnica apresenta qualidade superior, quando comparado aos demais.

TABELA 1. Ação antimicrobiana do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* em diferentes concentrações

Óleo essencial (%)	<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 1969
16%	+
8%	+
4%	+
2%	+
1%	+
0,5%	+
0,25%	+
0,125%	+
0,0625%	+
Controle positivo	-
Viabilidade da cepa*	+

+ Crescimento do microrganismo;

- Inibição do microrganismo.

*crescimento da bactéria sem adição de óleo essencial ou antibiótico padrão.

O dióxido de carbono é gasoso sob condições normais, não tóxico e inofensivo à saúde. Isto significa que o CO₂ evapora completamente após a extração e algum resíduo presente não será problema, pois é inofensivo. O extrato não sofre nenhuma degradação durante o processo de remoção do solvente e por isso possui qualidade superior à dos produtos extraídos convencionalmente (Sovová, 1994).

Porém, a hidrodestilação, que foi a técnica utilizada neste trabalho, é amplamente empregada nos laboratórios das universidades justamente pela sua praticidade e baixo custo. No entanto, a desvantagem da técnica devido à utilização de temperaturas relativamente elevadas (100°C) por um longo período de tempo pode levar a formação de compostos indesejáveis, tais como: a hidrólise de ésteres, isomerizações, rearranjos, racemizações e oxidações (Sinhá, et al., 1992 apud Gomes, 2003).

Em relação às características do óleo essencial, sua menor ou maior atividade biológica depende de sua composição química. Para Simões & Spitzer (2004), diferenças de solo, clima, tipo de cultivo, tempo de exposição ao sol e vento podem influenciar na concentração e na composição dos óleos essenciais. Assim, a época da coleta também pode ser uma das causas da atividade antibacteriana ter sido diferente. Apel et al. (2002) e Azevedo et al. (2006) citam ainda variações genéticas intraespecíficas da espécie vegetal e padrões de variação geográfica, tais como: latitudes e longitudes.

Quanto à tintura de própolis, pode-se verificar que a mesma é eficaz para o tratamento da acne, sendo a bactéria *P. acnes*, sensível a esse composto (Tabela 2). O fato da inibição do crescimento deve-se ao complexo mecanismo de ação proveniente dos compostos presentes na

TABELA 2. Ação antimicrobiana das tinturas de própolis em diferentes concentrações

Tintura de própolis (%)	<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 1969
10%	-
5%	-
2,5%	-
1,25%	-
0,625%	-
0,3125%	+
0,15625%	+
0,073125%	+
Controle positivo	-
Viabilidade da cepa	+

+ Crescimento do microrganismo
- Inibição do microrganismo.

resina que é constituída dos óleos essenciais das plantas visitadas na região em que a colméia se encontra e de onde as abelhas melíferas coletaram os exsudatos (Vargas, et al., 2004.)

A própolis é composta basicamente por flavonoides, dentre eles flavonas, destacando-se a quercetina, e também flavononas, diidroflavonas, isoflavonas e chalconas. A atividade antimicrobiana de flavonoides está relacionada à sua estrutura molecular, e, através desse nível estrutural, é caracterizado o potencial contra o crescimento bacteriano (Marcucci, 2002; Pereira et al., 2002; Taguri, et al., 2004).

Para Souza (2009), sua ação é proveniente da capacidade de interação da estrutura dos flavonoides, que tem característica lipofílica, com a membrana plasmática provocando a desorganização da mesma. Assim, a membrana perde suas funções de permeabilidade e proteção, entre outras, desregulando a entrada e saída de substâncias e alterando a pressão intracelular fazendo com que a célula bacteriana se rompa.

Por outro lado, descobriu-se também que flavonoides podem inibir a DNA girase, enzima responsável por separar a dupla hélice no momento da replicação (Cushnie; Lamb, 2006 apud Paker & Luz, 2007).

CONCLUSÕES

A ação antimicrobiana do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. contra a *Propionibacterium acnes* não foi efetiva na concentração utilizada. No entanto, ainda devem ser realizados estudos mais aprofundados sobre uma concentração que possa ser eficaz.

Pode-se verificar que a tintura de própolis apresentou atividade antibacteriana frente à *Propionibacterium acnes*. A tintura de própolis teve ação em várias concentrações, sendo a concentração inibitória mínima de 0,625%.

Sabe-se que a própolis apresenta propriedades cicatrizantes, podendo ser esta outra característica explorada para o tratamento da acne. A partir desses dados, sugere-se a elaboração de formulações cosméticas que sejam menos agressivas, mas que proporcionem a eficácia dos fármacos frequentemente utilizados para acne.

REFERÊNCIA

- AGOSTINI, F. et al. Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 15, n. 3 p. 215-219, 2005.
- APEL, M. A. et al. Composição química do óleo volátil de

- Myrcianthes* nativas da região sul do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 402-407, 2006.
- AZEVEDO, N. R. et al. Essential oil chemotypes in *Hyptis suaveolens* from Brazilian Cerrado. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, n. 3, p. 205-216, 2002.
- BORRELLI, F et al. Phytochemical compounds involved in the anflamatory effect of propolis extract. **Fitoterapia**, v.73 n.1 p.S53-S63, 2002.
- BURIOL L. et al. **Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico**. **Química Nova**, v.32, n.2, 2009.
- COSTA, A. G. L. C.; **Estudo químico de *Baccharis dacunculifolia* D.C. e sua correlação com a própolis de uma microrrelação dos Campos Gerais do Paraná**. 2009.74f. Dissertação (Mestrado em Química), Departamento de Química, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná.
- CHOMNAWANG, M. T. et al. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, n.101, p. 330–333, 2005.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed.. São Paulo, SP: Atheneu, 2000. Parte II.
- FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. **Ciência &Tecnologia Alimentícia**, v.26, n.1, p. 171-178, 2006.
- GOMES, F. **Estudo dos compostos voláteis do alecrim utilizando as técnicas de microextração em fase sólida (SPME), hidrodestilação e extração com fluido supercrítico (SFE)**. 2003. 77f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.
- LUSTOSA, S. R.; et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p.447-454, 2008.
- MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v.19, n.5, p. 529-536, 1996.
- MARCHIORI, V. F. ***Rosmarinus officinalis***. Monografia (Curso de Fitomedicina). 2004.32f. Fundação Herbarium; Associação Argentina de Fitomedicina, Argentina.
- MENEZES, H. **Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas**. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.3, p.405-411, 2005.
- MUIZZUDDIN N. et al. Acne – a multifaceted problem. **Drugs Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 5, n. 2, p. 183-188, 2008.
- NEWALL, C. A. et al. **Plantas Medicinais - Guia para profissional de saúde**, Ribeirão Preto-SP: Premier, p. 308, 2002.
- PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p. 102-107, 2007.
- PARK, J. et al. In vitro antibacterial and anti-inflammatory effects of honokiol and magnolol against *Propionibacterium*. **European Journal of Pharmacology**, n. 496, p. 189-195, 2004.
- PEREIRA, A. S. et al. **Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras**. **Química Nova**, v.25, n.2, p. 321-326, 2002.
- PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus Officinalis* L.): Propriedades Antimicrobiana e Química do Óleo Essencial. **Boletim CEPPA**, v. 19, n. 2, p. 193-210, 2001.
- SCAZZOCCHIO F, et al. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiological Research**, v. 161, n. 4, p. 327-333, 2006.
- SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Óleos Voláteis, Farmacognosia da planta ao medicamento**, 5ª ed. rev. atual, p. 467-468, Porto Alegre/Florianópolis: UFGS; 2004.
- SOUZA, A. J. F. de. **Avaliação dos Efeitos antimicrobianos de rutina e quercetina in vitro**. 2009. 62f. Dissertação (Mestrado em biologia) Departamento de Biologia. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- SOVOVÁ, H., Rate of the Vegetable Oil Extraction with Supercritical CO₂ – I. Modeling of Extraction Curves. **Chemical Engineering Science**, v.49,n.3, p. 409-414, 1994.
- STEVENSEN, C. J. Aromatherapy in Dermatology. **Clinics in Dermatology**, n.16, p. 689-694, 1998.
- TAGURI, T. et al. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n.12, p.1965-1969, 2004.
- TSAI, T. H. et al. J. In vitro antimicrobial and anti-inflammatory effects of herbs against *Propionibacterium* acnes. **Food Chemistry**, v. 119, p. 964-968, 2010.
- UZEL, A. et al. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiological Research**, v.160, n.2, p.189-195, 2005.
- VARGAS, A. C. et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato etanólico de própolis. **Ciência Rural**, v. 34, p. 159-163, 2004.
- WECKESSER, S. et al. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. **Phytomedicine**, n. 14, p. 508-516, 2007.