

ARTIGO ORIGINAL

AVALIAÇÃO DO EFEITO PREBIÓTICO DE HIDROLATOS SOBRE STAPHYLOCOCCUS SP. PRESENTE NA MICROBIOTA CUTÂNEA

AUTORES: MARCO AURÉLIO DA SILVA¹; JULIANA DE OLIVEIRA SOARES¹;
LEONARDO MENDES BELLA^{1,2}; CARLOS ROCHA OLIVEIRA^{1,2,A}

¹Grupo de Fitocomplexos e Sinalização Celular, Escola de Ciências da Saúde, Universidade Anhembi Morumbi, São Paulo, Brasil.

²Instituto de Osmologia e Óleos Essenciais, Minas Gerais, Brasil.

RESUMO

As plantas ao sintetizar metabólitos secundários, também conhecidos como princípios ativos, que podem agir de forma diferente sobre outros seres vivos, despertam cada vez mais o interesse das indústrias farmacêutica e cosmética, uma vez que podem desenvolver formulações contendo prebióticos, substâncias que auxiliam no controle do microbioma cutâneo. Neste trabalho foram avaliados os efeitos prebióticos dos hidrolatos de alecrim, erva cidreira, lemongrass, lavanda e menta. A taxa de crescimento da cepa *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), foi significativamente menor (* $p < 0,05$), quando comparada a cepa de *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), após tratamento com os hidrolatos de alecrim, menta e erva cidreira. Em relação aos resultados do co-cultivo, foi observado qualitativamente, que a cepa de *S. aureus* não conseguiu atingir crescimento satisfatório na presença de *S. epidermidis* associado aos hidrolatos, uma vez que o ponto de “viragem” do ágar manitol não foi alcançado plenamente, sugerindo que estes subprodutos da extração de óleos essenciais pode apresentar efeito prebiótico.

Palavras-chave: Hidrolatos, prebiótico, microbiota, pele.

ABSTRACT

By synthesizing secondary metabolites, also known as active ingredients, which can act differently on other living beings, they are increasingly attracting the interest of the pharmaceutical and cosmetic industries, since they can develop formulations containing prebiotics, substances that help in the control of the cutaneous microbiome. In this work, the prebiotic effects of rosemary, lemongrass, lemongrass, lavender and mint hydrolates were evaluated. The growth rate of the *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) strain was significantly lower (* $p < 0.05$), when compared to the *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) strain, after treatment with rosemary, mint and herb hydrolates lemon balm. Regarding the results of co-cultivation, it was observed qualitatively that the strain of *S. aureus* failed to achieve satisfactory growth in the presence of *S. epidermidis* associated with hydrolates, since the “turning point” of mannitol agar was not reached fully, suggesting that these by-products from the extraction of essential oils may have a prebiotic effect.

Keywords: Hydrolates, prebiotic, microbiota, skin.

^AAutor correspondente

Carlos Rocha Oliveira - E-mail: carlos.oliveira@laureate.com.br - ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8634-2850>

DOI: <https://doi.org/10.46675/rbcm.v1i1.7>. Artigo recebido em: 31 de janeiro de 2020; aceito em 15 de fevereiro de 2020; publicado em 30 de abril de 2020 na Revista Brasileira de Ciências Biomédicas, abril 2020, disponível online em www.rbcm.com.br. Todos os autores contribuíram igualmente com o artigo. Os autores declaram não haver conflito de interesse Este é um artigo de acesso aberto sob a licença CC - BY: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>

INTRODUÇÃO

A diversidade de substâncias ativas encontradas em plantas com emprego terapêutico tem sido objeto de interesse das indústrias cosmética e farmacêutica (1).

Neste sentido, os óleos essenciais, que constituem a fração volátil de plantas aromáticas, destacam-se por apresentarem diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, além de demonstrarem importante ação antimicrobiana (2).

Os hidrolatos, também conhecidos como água floral ou Hidrossol, são subprodutos obtidos a partir do processo de destilação de óleos essenciais, contendo substâncias aromáticas, que são utilizadas pela indústria cosmética (3).

A microbiota da pele apresenta papel fundamental na manutenção e na proteção da pele. O contato diário com cosméticos e medicamentos, bem como com outros agentes químicos, físicos e microbiológicos, pode alterar o equilíbrio da microbiota cutânea, reduzindo a população de bactérias saudáveis, tornando necessário a sua recomposição (4,5).

Sendo assim, há aumento do interesse no desenvolvimento de cosméticos contendo prebióticos em sua formulação, uma vez que controlam o microbioma cutâneo ao atuarem contra os microrganismos indesejáveis ao mesmo tempo que contribui para manutenção da microbiota ao estimular o crescimento das bactérias saudáveis da pele (6).

Na cosmetologia, o termo prebiótico é usado em um contexto mais amplo, ou seja, como substâncias que podem ser exploradas por bactérias benéficas ou como substâncias produzidas por microrganismos (como mencionado acima, também são frequentemente chamados de ingredientes probióticos em relação aos cosméticos) (7, 8)

Dessa forma, o presente trabalho avaliou efeito prebiótico de diferentes hidrolatos em cepas de *Staphylococcus* spp.

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes, Químicos e Cepas

As amostras de hidrolatos de Menta, Lemon Grass, Lavanda, Erva Cidreira e Alecrim, foram gentilmente cedidos pela empresa WNF Ind. Com. LTDA. Foram utilizadas cepas de *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) cultivadas nos meios Manitol, *Brain Heart Infusion* (BHI), *Tryptone Soya Agar* (TSA) e Muller Hinton. Todos os reagentes e as cepas foram gentilmente cedidos pela Escola de Ciências da Saúde, da Universidade Anhembí Morumbi. Todos os experimentos foram realizados laboratório biomédico da mesma instituição.

Estudo da taxa de crescimento por espectrofotometria

Para distinguir a taxa de crescimento de duas linhagens, medimos o número de colônias para cada vez. 1×10^6 UFC/mL de *S. epidermidis* foi inoculado em PBS com 0,5% de cada hidrolato em condições estéreis e contado o número de colônias após 24h pelo teste de profundidade *pour plate* em ágar. Além disso, as bactérias foram inoculadas em 15 ml de caldo Muller Hinton (MHB, Sigma-Aldrich, Ottawa, Canada, EUA) e cultivadas durante a noite a 37°C. O crescimento celular foi determinado medindo a densidade óptica a 600 nm utilizando um espectrofotômetro.

Teste de sensibilidade dos microrganismos aos hidrolatos

Em tubos de ensaio contendo 3,5 mL de salina, as cepas dos microrganismos avaliados foram inoculadas e incubadas por 24 h, à 37°C, afim de promover o crescimento das bactérias. Após isso, foi preparado o inóculo bacteriano e vertido o ágar relativo à cepa ensaiada. Após a solidificação do ágar BHI, foram realizados orifícios utilizando cânulas de vidro (6 mm de diâmetro) devidamente esterilizadas, de modo que nestas cavidades foram depositados 10, 15 e 20 microlitros (μ L) de cada hidrolato.

Teste de crescimento microbiano – pour plate

As cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* foram inoculadas em dois tubos de ensaio contendo solução salina. Em seguida, foi transferido 0,1 mL dos tubos contendo as cepas para outro tubo com 9,9 mL realizando a diluição de (1:10) em seguida deste mesmo tubo foi transferido 0,9ml outro tubo com 9,9 mL (1:100) em seguida foi realizada uma nova diluição transferindo 0,1 mL do tubo anterior para outro tubo contendo 9,9 mL de solução salina (1:1000), após realizar as diluições foi realizado o plaqueamento das diluições retirando 1ml de cada diluição e misturado com 10 μ L de diferentes hidrolatos. Após isso, o volume foi transferido para placas de petri estéreis, em seguida colocou-se de 15 a 20 mL de ágar BHI fundindo em cada uma das placas realizando movimentos circulares (formato de 8) para dispersar o máximo possível as diluições. Por fim, as placas foram levadas para a estufa e mantida a 37°C por 24 horas para que fosse realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL).

Avaliação da ação prebiótica dos hidrolatos por meio de co-cultivos em ágar manitol

Para verificarmos a eficácia prébiótica dos hidrolatos em contato com as cepas bacterianas em meio ágar manitol foram realizados alguns testes para verificar a possível inibição da cepa bacteriana de *S. aureus* em relação ao hidrolatos e as cepas de *S. epidermidis*. Para isso, foram inoculadas as cepas bacterianas juntas em um tubo de ensaio contendo o ágar manitol. Em seguida, com o auxílio de uma alça bacteriológica, foram inoculados os hidrolatos em tubos de ensaio contendo as duas cepas que, posteriormente, foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

Análise Estatística

Foi utilizado o teste *t* de Student para amostras em triplicata. Valores de *p* inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas sintetizam muitos metabólitos secundários, também conhecidos como princípios ativos, que podem agir de forma diferente sobre outras espécies (9). O presente trabalho avaliou o possível efeito prebiótico de alguns hidrolatos, comparando a taxa de crescimento das cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis*. Assim, foi verificado que a cepa de *S. aureus* tratada com os hidrolatos de alecrim, menta e erva cidreira apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) nas UFC/mL, quando comparado à cepa de *S. epidermidis* (Figura 1).

O mesmo padrão de resultado foi observado na análise quantitativa do crescimento bacteriano, quando foram comparadas as taxas de crescimento das cepas na presença dos hidrolatos. Assim, corroborando os dados de UFC/mL apresentados na figura 1, foram observadas aumento significativo ($p < 0,05$) no percentual de crescimento da cepa de *S. epidermidis*, quando comparado à cepa de *S. aureus* após tratamento com os hidrolatos de alecrim, menta e erva-doce (Figura 2). Também foi possível observar que a cepa de *S. aureus* tratada com hidrolatos de lavanda e lemongrass, apresentou aumento na taxa de crescimento quando comparada à cepa de *S. aureus* não tratada.

Em seguida, foram realizados co-cultivos em ágar manitol para verificarmos a capacidade de inibição do crescimento de *S. aureus* por parte do *S. epidermidis*, na presença dos hidrolatos avaliados neste estudo.

Os ensaios de co-cultivo em ágar manitol com *S. aureus* e *S. epidermidis*, na presença de diferentes hidrolatos, mostraram que alguns hidrolatos como erva cidreira, alecrim, menta e gerânio, foram capazes de interferir na “viragem”

do indicador do meio manitol quando comparado ao tubo contendo apenas cepas testadas e meio manitol, sugerindo que esta ação seja consequência de maior crescimento da cepa *S. epidermidis* (na presença do hidrolatos), que foi capaz de criar um ambiente de competição e inibir o crescimento de *S. aureus*.

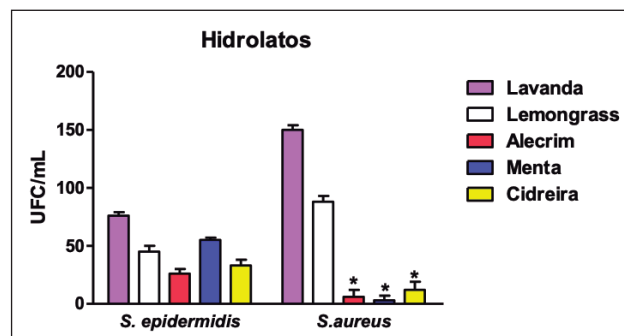


Figura 1: Número de UFC/mL após tratamento das cepas com diferentes hidrolatos. Período de incubação e contagem, 24 horas.

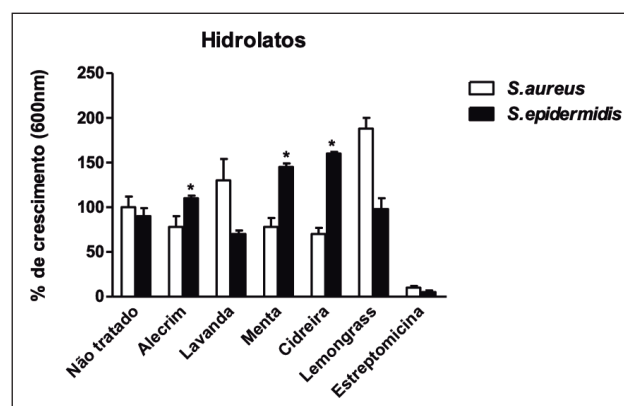


Figura 2: Porcentagem de crescimento das cepas avaliadas após tratamento com diferentes hidrolatos. Período de incubação e contagem, 24 horas.

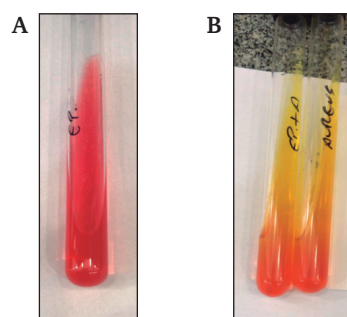


Figura 3: (A) Imagem contendo apenas *S. epidermidis*. (B) Imagem dos tubos contendo ágar manitol e co-cultivados com *S. aureus* e *S. epidermidis*.

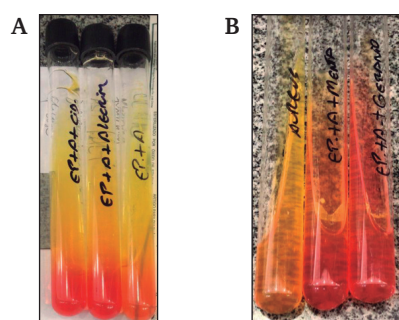


Figura 4: Imagem dos tubos contendo ágar manitol e co-cultivados com *S. aureus* e *S. epidermidis*, na presença de diferentes hidrolatos. (A) Note a presença dos hidrolatos de Erva Cidreira e Alecrim, reduzindo a “viragem” do indicador do meio manitol quando comparado ao tubo contendo apenas cepas testadas e meio manitol. (B) De modo semelhante, os hidrolatos de menta e gerânio também reduziram a o ponto de “viragem” do indicador do meio manitol quando comparado ao tubo contendo apenas cepas testadas e meio manitol.

A disbiose da pele é definida como um estado de desequilíbrio no microbioma da pele (10,11). Evidências crescentes indicam que bactérias probióticas no microbioma da pele podem mediar a fermentação (12) para conter o crescimento excessivo de patógenos oportunistas (13,14). As espécies estafilocócicas coagulase-negativas, como *S. epidermidis* e *Staphylococcus hominis* (*S. hominis*) são espécies bacterianas que predominantemente colonizam a pele humana normal (15), enquanto *S. aureus* frequentemente colonizam a pele em desequilíbrio/doente (16). Recentemente, cepas de *S. epidermidis* e *S. hominis* reintroduzidas em pacientes com dermatite atópica, promoveram redução na colonização de *S. aureus* (17). Evidências de que espécies comensais de *Staphylococcus* fornecem defesa do hospedeiro também foram observadas em estudo onde a colonização nasal com uma cepa de *S. epidermidis*, capaz que produz uma enzima serino protease, ou ainda, uma cepa de *Staphylococcus lugdunensis*, que produz um peptídeo cíclico contendo tiazolidina, inibiram a colonização nasal por *S. aureus* (13, 18).

Desta forma, com as evidências que o microbioma cutâneo tem um papel importante na promoção da defesa do hospedeiro, e a partir dos nossos resultados, sugerimos que os hidrolatos aqui avaliados e que apresentaram resultados satisfatórios, possam ser utilizados como prebióticos em formulações cosméticas.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem que alguns hidrolatos avaliados neste estudo podem apresentar efeito prebiótico, uma vez os testes realizados mostraram a redução na taxa de crescimento das cepas de *S. aureus*, na presença de cepas de *S. epidermidis* associado à esses hidrolatos, demonstrado tanto pelos testes quantitativos, como pelos testes qualitativos. Esses achados lançam luz sobre a utilização de alguns hidrolatos como agentes prebióticos, dentro de um raciocínio ecologicamente sustentável, utilizando um subproduto da obtenção de óleos essenciais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- FRANZENER, G.; MARTINEZ-FRANZENER, A.S.; STANGARLIN, J.R.; CZEPAK, M. P.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F Maria Eugênia Silva Cruz. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, 28(1):29-38, 2007.
- 2- ARAÚJO, J.C.L.V.; LIMA, E.O.; CEBALLOS, B.S.O.; FREIRE, K.R.L.; SOUZA, E.L.; SANTOS FILHO, L. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. Rev. Patol. Trop. 33: 55-64, 2004.
- 3- SIQUI, A.C.; SAMPAIO, A.L.F.; SOUSA, M.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; RAMOS, M.F.S. Óleos essenciais - potencial anti-inflamatório. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento 16: 38-43, 2000.
- 4- MORO, G.; ARSLANOGLU, S.; STAHL, B. A mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of atopic dermatitis during the first six months of age. Arch Dis Child. 91:814-819, 2006.
- 5- GRUBER C, VAN STUJVENBERG M, MOSCA F, et al. Reduced occurrence of early atopic dermatitis because of immuneactive prebiotics among low-atopy-risk infants. J Allergy Clin Immunol. 126:791-797, 2010.
- 6- KANTOR, R., & SILVERBERG, J. I. Environmental risk factors and their role in the management of atopic dermatitis. Expert review of clinical immunology, 13(1), 15-26, 2017. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2016.1212660>
- 7- SIMMERING R, BREVES R. Pre- and probiotic cosmetics. Hautarzt. 60(10):809-14, 2009. doi: 10.1007/s00105-009-1759-4.
- 8- MARLIES, W.; CARSTEN, L.; FRANS, C. The Danish Environmental Protection Agency/ Survey of cosmetic products with “probiotic” or “prebiotic” claims. Survey of chemical substances in consumer products N°. 171

November 2018.

9- ANGÉLICO, E.C.; COSTA, J.G.M.; GALVÃO, F.F.R.; SANTOS, F.O.; RODRIGUES, O.G. Composição química do óleo essencial das folhas de *Croton heliotropiifolius* Kant (Sinônimo *C. rhamnifolius*): resultados preliminares. *Revista de Biologia e Farmácia*, 7(1), 2012.

10. KAUR N., CHEN C.-C., LUTHER J., KAO J.Y. Intestinal dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut Microbes*. 2011; 2:211–216. doi: 10.4161/gmic.2.4.17863

11. GRICE E.A., SEGRE J.A. The human microbiome: Our second genome. *Annu. Rev. Genomics Human Genet.* 2012; 13:151–170. doi: 10.1146/annurev-genom-090711-163814.

12. REN T., GLATT D.U., NGUYEN T.N., et al. 16 S rRNA survey revealed complex bacterial communities and evidence of bacterial interference on human adenoids. *Environ. Microbiol.* 2013; 15:535–547. doi: 10.1111/1462-2920.12000.

13. IWASE T., UEHARA Y., SHINJI H., TAJIMA A., et al. *Staphylococcus epidermidis* Esp. inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature*. 2010; 465:346. doi: 10.1038/nature09074.

14. NAIK S., BOULADOUX N., WILHELM C., et al. Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals. *Science*. 2012; 337:1115–1119. doi: 10.1126/science.1225152.

15. W. E. KLOOS, M. S. MUSSELWHITE. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. *Appl. Microbiol.* 30, 381–385 (1975).

16. A. L. BYRD, C. DEMING, S. K. B. CASSIDY, O. J. HARRISON, et. al. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strain diversity underlying pediatric atopic dermatitis. *Sci. Transl. Med.* 9, eaal4651 (2017).

17. T. NAKATSUJI, T. H. CHEN, S. NARALA, K. A. CHUN, A. M. TWO, et al. Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis. *Sci. Transl. Med.* 9, eaah4680 (2017)

18. A. ZIPPERER, M. C. KONNERTH, C. LAUX, et al. Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature* 535, 511–516 (2016).