

---

# Atividade antimicrobiana da Oleuropeína e do Hipoclorito de Sódio, isolados e combinados, na inativação de células em suspensão de *Staphylococcus aureus*

*Antimicrobial activity of Oleuropein and Sodium Hypochlorite, isolated and combined, in the inactivation of suspended cells of Staphylococcus aureus*

Sara Ester Barbosa<sup>1</sup>, Laura Cristina da Cruz Dominciano<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Curso de Enfermagem da Universidade Paulista, São José do Rio Pardo-SP, Brasil; <sup>2</sup>Curso de Ciências Biológicas da Universidade Paulista, São José do Rio Pardo-SP, Brasil.

---

## Resumo

**Objetivo** – Verificar ação antimicrobiana da Oleuropeína isolada e em conjunto como Hipoclorito de Sódio 1%. **Métodos** – A resistência a sanitizantes foi avaliada pela Concentração Inibitória Mínima (CIM) para SA (cepa ATCC 25923) Laborclin® Brasil, utilizando-se o método de diluição em caldo e incubados a 37°C/24h para comparação dos tubos. Para o método disco difusão em ágar (DDA), após correção das bactérias em 108 UFC (escala 0,5 McFarland) foram plaqueadas pela técnica swab de algodão padronizado, para espalhamento da suspensão na placa de Petri contendo TSA (Ágar Tríptico de Soja, Sigma-Aldrich). Colocou-se discos de 6mm de papel filtro, embebidos nos sanitizantes e incubados em estufa a 37°C/24h, seguida da leitura dos halos de inibição. **Resultados** – A turvação e o halo de inibição aponta a Ole mais eficaz contra as células de *Staphylococcus aureus* em relação ao HS 1%. Isso ocorre devido ao fosfatidilglicerol presente nos derivados da Oliveira. **Conclusão** – A OLE tem efeito sanitizante contra a *S. aureus*, porém são necessários novos estudos. O HS não deve sofrer diluições para a limpeza das superfícies hospitalares para não perder seu efeito antibacteriano.

**Descritores:** Oleuropeína; Hipoclorito de sódio; *Staphylococcus aureus*

## Abstract

**Objective** – to verify the antimicrobial action of Oleuropein alone and together as Sodium Hypochlorite 1%. **Methods** – The resistance to sanitizers was evaluated by the Minimum Inhibitory Concentration (CIM) for SA (strain ATCC 25923) Laborclin® Brasil, using the dilution method in broth and incubated at 37°C / 24h for comparison of tubes. For the disc agar diffusion method (DDA), after correction of the bacteria in 108 CFU (0.5 McFarland scale), they were plated using the standardized cotton swab technique to spread the suspension on the Petri dish containing TSA (Triptych Soy Agar, Sigma-Aldrich). 6mm discs of filter paper were placed, soaked in sanitizers and incubated in an oven at 37°C / 24h, followed by the reading of the inhibition halos. **Results** – Turbidity and the tip of Ole inhibition halo more effective against *Staphylococcus aureus* cells in relation to HS 1%. This is due to the phosphatidylglycerol present in the derivatives of Oliveira. **Conclusion** – OLE has a sanitizing effect against *S. aureus*, however further studies are needed. HS should not be diluted to clean hospital surfaces so as not to lose its antibacterial effect.

**Descriptors:** Oleuropein; Sodium hypochlorite; *Staphylococcus aureus*.

---

## Introdução

Com a resistência dos microrganismos, as instituições vêm investindo em novos saneantes, tendo como objetivo minimizar as Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS).

Segundo o Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde, PNPCIRAS, (ANVISA, 2016)<sup>1</sup>, quando reconhecida a magnitude do problema e aderido programas para prevenção e controle de IRAS, as infecções caem até 70%.

Uma forma eficaz de diminuir a incidência de IRAS é a higienização de superfícies, com métodos e produtos eficientes. O profissional, ao entrar em contato com as superfícies, deposita grandes cargas microbianas, com isso, os instrumentos utilizados para o atendimento ao paciente, quando colocado nas superfícies com microrganismos, são contaminados, ocasionando uma infecção cruzada.

As IRAS são comuns e relevantes devido à sua frequência, morbidade e mortalidade, destacando-se den-

tre elas as infecções ocasionadas pela bactéria *Staphylococcus aureus* (LIMA, 2015)<sup>2</sup>.

*S. aureus*, presente na microbiota humana, tem sido considerada um dos principais agentes de infecções em ambientes hospitalares. Sua transmissão pode se dar por contato interpessoal direto e também por meio de objetos contaminados (OLIVEIRA, 2015)<sup>3</sup>. Segundo Azulay<sup>4</sup>, 1997 e Teixeira<sup>5</sup>, 2005, as manifestações da *S. aureus* podem ser tanto superficiais como abscessos cutâneos, como sistêmicas, sendo a pneumonia.

Outros estudos apontam que a bactéria se caracteriza por ser sensível à alta temperatura, soluções antissépticas e sanitizantes como o Hipoclorito de Sódio 1%, porém, pode desenvolver resistência. O HS é um grande saneante utilizado pelos hospitais, pela sua ação bactericida, o mesmo carrega uma ação antibacteriana contra vários tipos de microrganismos, entre eles a *Staphylococcus aureus*.

Segundo Srebernich<sup>6</sup>, 2007, a ação sanitizante do HS é exercida a partir da destruição da cápsula bacteriana de proteção e a oxidação do protoplasma celular,

formando cloraminas tóxicas que vão alterar a permeabilidade celular, impedindo a regeneração enzimática, porém pode causar resistência bacteriana.

A partir disso pesquisas vem sendo feitas com a Oleuropeína (OLE), um composto das folhas de oliveiras. O polifenol ocupa cerca de 73% do total dos compostos (PEREIRA et al., 2007)<sup>7</sup>.

Descoberta em 1908 por Bourquelet e Vintilesco (RANALLI et al., 2006)<sup>8</sup>, possui grandes benefícios, como redução de inflamações, combate de infecções virais, fortalecimento do sistema imunológico, propriedades anticancerígenas, combate doenças cardiovasculares, osteoporose (MILLEZI, 2012)<sup>9</sup> e é antibacteriana. A OLE se mostra um eficiente sanitizante orgânico, que, por sua origem, facilita a penetração na membrana celular, destruindo as bactérias resistentes a sanitizantes comuns.

O presente trabalho visou à averiguação da oleuropeína usada em conjunto com o hipoclorito de sódio a 1% ou isoladamente, a fim de saber sobre a destruição da bactéria *Staphylococcus aureus*.

## Métodos

O conjunto de atividades globais a serem realizados no experimento encontra-se representado esquematicamente no fluxograma da Figura 1.

### Isolado bacteriano

Para este estudo foram utilizados isolados de *Staphylococcus aureus* (cepa ATCC 25923) Laborclin®, Brasil, obtidas comercialmente e mantidas sob -80°C em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI - Brain Heart Infusion) (Merck, Alemanha) com glicerol (Synth, Brasil)

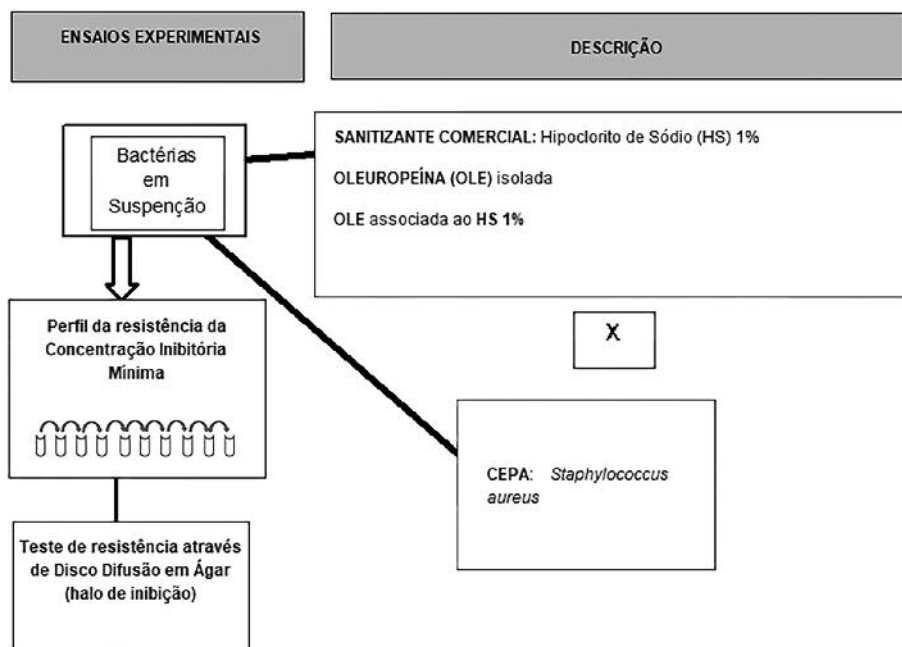
a 15% (v/v) para formar uma suspensão de estoque, armazenados no laboratório de Microbiologia da UNIP – Universidade Paulista, Campus São José do Rio Pardo/SP.

### Avaliação comparativa da atividade bactericida da oleuropeína com o sanitizante químico Hipoclorito de Sódio

#### Perfil de resistência por determinação da Concentração Inibitória Mínima

A Oleuropeína utilizada neste experimento foi obtida da Empresa Folhas de Oliva, doação do proprietário Cosmo Pacetta, que forneceu a concentração para experimento, através da cromatografia líquida de alta eficiência (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), cujo método de análise foi em Cromatógrafo Shimadzu série 20<sup>a</sup>. Coluna: Nucleodur C18 250 x 3.0 mm, 5µm (Macharey Nagel). Fase móvel: Metano/ácido trifluoroacético 0,1% em água (40:60), pH 2,0, fluxo 0,7 ml/min. Detector UV a 280. Volume de injeção: 20µl. Padrão de Oleuropeína cat N0 008011 – 96,6% (Chengdu Biopurify Phytochemicals). Amostra OLIVEAGE lote 01/2013, líquido, teor de oleuropeína 29,3 mg/100 ml, 0,03% (p/v), 293 mg/L. Essa metodologia foi baseada nos estudos de Dominciano (2015)<sup>10</sup>.

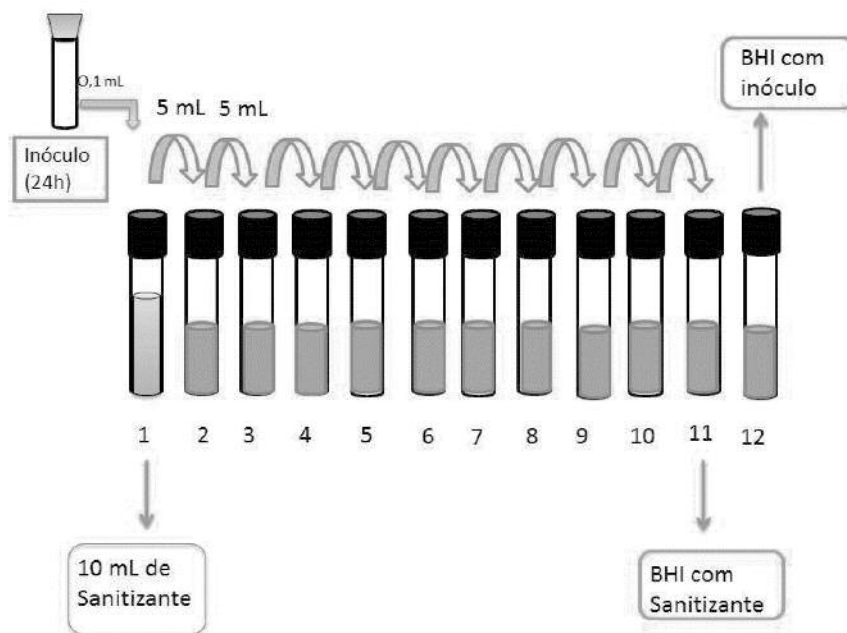
Além da OLE, foi utilizado o princípio ativo do sanitizante químico Hipoclorito de Sódio 1%, para fins de comparação com a atividade bactericida da oleuropeína.



**Figura 1.** Fluxograma representando os diferentes métodos utilizados para avaliação da redução de *S. aureus* como células em suspensão ao ser testados com a oleuropeína isolada ou associada ao sanitizante hipoclorito de sódio, em suas análises quantitativas



**Figura 2.** Esquema do método de diluição em caldo. O 1º tubo será retirado 5 mL de sanitizante e inserido no 2º tubo e assim sucessivamente. Os controles serão os tubos 11(C-), contendo BHI com sanitizante e o tubo 12(C+), que contém apenas BHI com o inóculo.



**Figura 3.** Imagem dos tubos contendo Oleuropeína e a turvação negativa.

O perfil de resistência a sanitizantes foi avaliado através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para a bactéria testada, utilizando-se o método de diluição em caldo, que mede quantitativamente a atividade in vitro de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano. Para a realização do teste, foram preparados tubos de ensaio com meio de cultura BHI para a bactéria *S. aureus*. A seguir, os tubos foram inoculados com uma suspensão padrão do organismo (100 µL) testado contra diversas concentrações dos agentes antimicrobianos. Após incubação a 37°C/24 horas, foi feita a comparação visual dos tubos.

Foram distribuídos 5 mL de meio de cultura BHI para cada tubo, exceto para o primeiro. Todos os tubos foram autoclavados com o meio de cultura a 121°C por 15 minutos. Os experimentos foram realizados com sanitizante puro e com o sanitizante acrescido de oleuropeína (para cada 10 mL de sanitizante foi acrescido 5 mg de oleuropeína).

Em uma série de 12 tubos de ensaio com meio de cultura BHI foram acrescentadas diversas concentrações dos agentes antimicrobianos, onde no primeiro tubo foi adicionado 10 mL de sanitizante (diluição 100%), sendo 5 mL transferidos para o segundo tubo (diluição

**Tabela 1. Diluição e conteúdo dos tubos de ensaio para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) DOMINCIANO (2015)<sup>10</sup>.**

Tubo	Diluição	Conteúdo
1	1:1 ou 100%	10 mL de sanitizante
2	1:2 ou 50%	5 mL de BHI e 5 mL de sanitizante do tubo 1
3	1:4 ou 25%	5 mL de BHI e 5 mL do tubo 2
4	1:8 ou 12,5%	5 mL de BHI e 5 mL do tubo 3
5	1:16 ou 6,25%	5 mL de BHI e 5 mL do tubo 4
6	1:32 ou 3,12%	5 mL de BHI e 5 mL do tubo 5
7	1:64 ou 1,56%	5 mL de BHI e 5 mL do tubo 6
8	1:128 ou 0,78%	5 mL de BHI e 5 mL do tubo 7
9	1:256 ou 0,39%	5 mL de BHI e 5 mL do tubo 8
10	1:512 ou 0,19%	5 mL de BHI e 5 mL do tubo 9
11	-	5 mL de BHI e 5 mL do tubo 10 (Controle -)
12	-	5 mL de BHI + CEPA (Controle +)

**Tabela 2. Resultado da CIM contra OLE e HS, isolados e misturados contra *S. aureus***

Sanitizantes	Concentração	Diluição/Tubo
OLE	5 ml	1:4
HS (1% v/v)	5 ml	1:2
OLE+HS (1% v/v)	10l	1:2

**Tabela 3. Suscetibilidade de *S. aureus* contra \*OLE e HS isolados e em combinação no método de disco difusão**

Solução/sanitizante	Diâmetro do Halo <sup>1</sup>	Classificação <sup>2</sup>
OLE (0,03% p/v)	8.7 ± 0.8	Intermediário
HS (1%, v/v)	7.1 ± 1.7	Intermediário
OLE+HS (1%, v/v)	7.5 ± 1.2	Intermediário

50%) e assim sucessivamente até o tubo 11. O tubo de número 11 foi considerado o controle negativo (BHI+ antimicrobiano) e o tubo de número 12 o controle positivo (BHI+ CEPA). Os tubos foram homogeneizados e, em seguida, incubados em estufa a 37°C/24h, para comparação visual. A CIM do antimicrobiano testado foi considerada como a concentração do tubo de maior diluição onde foi verificada a ausência de crescimento bacteriano (PACHECO, 2006)<sup>11</sup>. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

A Tabela 1 demonstra as concentrações de solução de sanitizantes nos tubos e os controles.

### Teste de Resistência através de Disco Difusão em Ágar

A resistência dos isolados de *S. aureus* à oleuropeína e ao sanitizantes comercial hipoclorito de sódio 1% foram testadas pelo método DDA, o qual foi adaptado da metodologia preconizada pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003)<sup>13</sup>. A cultura de bactérias foi corrigida em 108 UFC (escala 0,5 de McFarland) e logo após foram plaqueadas empregando-se a técnica de swab de algodão padronizado, previamente esterilizado, para espalhamento da suspensão na placa de Petri contendo TSA (Ágar Trípico de Soja, Sigma-Aldrich).

Foram colocados discos de 6mm de papel filtro, embebidos nos sanitizantes, em seguida, as placas de *S. aureus* foram incubadas em estufa a 37°C/24h.

## Resultados

### Concentração Inibitória Mínima

Os resultados da pesquisa foram baseados em experimentos realizados no laboratório da universidade para comprovar tal eficácia do sanitizante e a oleuropeína em conjunto ou isolados.

Nos tubos em que havia HS 1% isolado e HS+OLE misturado, a turvação iniciou a partir do 3º tubo (diluição 1:2) e os tubos com OLE isolados, a turvação ocorreu a partir do 4º tubo (diluição 1:4).

### Disco Difusão

Os resultados apontaram a classificação como intermediária para todas as placas, contudo os dados numéricos apontam que a Oleuropeína isolada teve ação mais eficaz comparada ao Hipoclorito de Sódio 1% isolado e em conjunto com a OLE.

## Discussão

Nos tubos em que havia HS 1% isolado e HS+OLE em conjunto, a turvação iniciou a partir do 3º tubo, demonstrando que quanto mais diluído o HS for, menor a eficácia. Pereira et al. (2015)<sup>13</sup> mostrou que o HS perdeu sua eficácia perante um aumento de matéria orgânica, ou seja, pode-se apontar que o HS usado em dissolução aumentada, permite aos microrganismos a capacidade de se tornarem resistentes, corroborando os resultados deste estudo.

Já os tubos com OLE isolados, a turvação ocorreu a partir do 4º tubo. Estudos de Dominciano et al. (2016a)<sup>14</sup>

e 2016b<sup>15</sup>) resultaram numa potencialização dos sanitizantes químicos quando misturados a OLE, o que não ocorreu neste estudo. Segundo a autora, OLE tem potencial antibactericida, o que pode facilitar sua atuação contra a membrana celular dos microrganismos de *S. aureus*, por ser um sanitizante orgânico.

No experimento realizado por Disco Difusão os resultados foram compatíveis com o experimento de CIM, pois apesar de todas as placas, os halos foram classificados como intermediários, os dados numéricos apontaram que a Oleuropeína é mais eficaz que o Hipoclorito de Sódio.

Embora os mecanismos de atividade antimicrobiana de OLE não sejam ainda completamente compreendidos, estudos anteriores (TATARIDOU; KOTZEKIDOU, 2015)<sup>16</sup> mostraram que OLE interage com fosfatidilglicerol na superfície da parede celular bacteriana, e causam alterações na membrana citoplasmática, o que poderia levar ao rompimento do envelope celular (CASAS-SANCHEZ, 2007)<sup>17</sup>. Os estudos de Dominciano (2016a)<sup>14</sup> apresenta que a OLE tem potencial para incrementar o efeito bactericida de sanitizantes, porém nesse estudo os resultados não defendem essa questão.

## Conclusão

Conclui-se que a OLE tem efeito sanitizante contra microrganismos em suspensão estudados in vitro de *S. aureus*, porém são necessários incentivos a novos estudos para um melhor entendimento do seu mecanismo de ação. Também é importante testar novos sanitizantes orgânicos com potencial antimicrobiano e antibactericida para redução das IRAS.

Contudo, o sanitizante químico HS não deve sofrer diluições não perder seu efeito antibacteriano.

## Referências

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BR). Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (2016-2020). Brasília: 2016.
2. Lima MFP, Borges MA, Parente RS, Júnior RCV, Oliveira ME. *Staphylococcus aureus*: As infecções hospitalares – revisão de literatura. Rev Uningá Review, 2015; 21(1):32-9.
3. Oliveira DB, Bombana CC, Rodrigues GAG, Gonçalves RJ, Parussolo L. Caracterização de *Staphylococcus aureus* isolados da barra de mão de carrinhos e alças de cestas de supermercados. Rev Ciênc Farm Básica Apl., 2015;36(3):407-12.
4. Azulay RD, Azulay DR. Piodermites, outras infecções bacterianas da pele e rickettsioses. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997.

5. Teixeira LM, Santos KRN, Bueris V, Trabulsi LR. *Staphylococcus aureus*. In: Trabulsi LR, Altherthum F (Org). Microbiologia. São Paulo: Atheneu, 2005.
6. Srebernich SM. Using chlorine dioxide and peracetic acid as substitutes for sodium hypochlorite in the sanitization of minimally processed green seasoning. Ciênc Tecnol Aliment. 2007; 27(4): 744-50.
7. Pereira AP, Ferreira IC, Marcelino F, Valentão P, Andrade PB. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. Molecules 2007, 12: 1153-62.
8. Ranalli A, Contento S, Lucena L, Di Febo M, Marchegiani D, Di Fonzo V. Factors affecting the contents of oleuropein in olive leaves (*Olea europaea* L.). J Agric Food Chem. 2006; 54(2): 434-40.
9. Millezi AF. Ação de óleos essenciais sobre biofilmes formados por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* [Tese]. Lavras-MG; Universidade Federal de Lavras, 2012.
10. Dominciano LCC. Avaliação de oleuropeína e de sanitizantes químicos, isolados ou associados, para eliminação de biofilmes de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em superfícies inertes [Tese]. Pirassununga: - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2015.
11. Pacheco JW. Guia Técnico ambiental de abates (bovino e suíno). São Paulo: CETESB, 2006.
12. National Committee For Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, 5<sup>th</sup> ed. Approved Standard M7-A5. Wayne-PA: NCCLS; 2000.
13. Pereira SSP, Oliveira HM, Turrini RNT, Lacerda RA. Desinfecção com hipoclorito de sódio em superfícies ambientais hospitalares na redução de contaminação e prevenção de infecção: revisão sistemática. Rev Esc Enferm USP. 2015; 49(4):681-8.
14. Dominciano LCC, Lee SH, Santello JM, Martinis ECP, Corassin CH, Oliveira CAF. Effect of oleuropein and peracetic acid on suspended cells and mono-species biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Integr Food Nutr Metab, 2016; 3(3): 314-7.
15. Dominciano LCC, Lee SH, Corassin CH, Martinis ECP, Oliveira CAF. Effects of Oleuropein and Peracetic Acid as Sanitizing Agents for Inactivation of *Listeria monocytogenes* Biofilms. Open Conference Proc J, 2016: 7(1).
16. Tataridou M, Kotzekidou P. Fermentation of table olives by oleuropeinolytic starter culture in reduced salt brines and inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol., 2015; 208:122-30.
17. Casas-Sanchez J, Alsina MA, Herrlein MK, Mestres C. Interaction between the antibacterial compound, oleuropein, and model membranes. Colloid Polym. Sci., 2007; 285:1351-60.

### Endereço para correspondência:

Sara Ester Barbosa  
Rua Vitória Satti, 190 – Jardim Primavera  
Vargem Grande-SP, CEP 13880-000  
Brasil

E-mail: sarabarbosa123.sb@gmail.com

Recebido em 2 de março de 2021  
Aceito em 25 de maio de 2021