

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *MENTHA PIPERITA* (HORTELÃ PIMENTA), *SYZYGIUM AROMATICUM* (CRAVO-DA-ÍNDIA) E *ORIGANUM MAJORANA* (MANJERONA)

Bruna Martinez Arroyo (PIC/Uem), Izabella Ventura de Souza, Tania Ueda Nakamura, Gislaine Franco de Moura Costa (Orientador), e-mail: gfmcosta@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.

Ciências Biológicas, Microbiologia.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, óleos essenciais.

Resumo:

Óleos e extratos de plantas há muito tempo têm servido de base para aplicações na medicina popular e, sendo o Brasil um país com grande biodiversidade muitas plantas são utilizadas popularmente no tratamento de doenças. Dessa forma o presente estudo tem o objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Mentha piperita* (Hortelã pimenta), *Syzygium aromaticum* (Cravo-da-índia) e *Origanum majorana* (Manjerona). Foram realizados ensaios de atividade antibacteriana e antifúngica a partir de óleos obtidos comercialmente. Foram testados quanto a concentração inibitória mínima (CIM), nas concentrações: 4000; 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 ul/ml em placa de 96 poços. As bactérias testadas foram *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e os fungos foram *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*, os testes foram de acordo com o preconizado pelo CLSI. Para determinar as concentrações fungicidas e bactericidas mínimas, uma porção onde o CIM foi determinado foram plaqueadas em meios adequados. O óleo essencial do *Syzygium aromaticum* apresentou maior atividade em relação à *Mentha piperita* e ao *Origanum majorana*, tanto no que se refere aos fungos quanto às bactérias.

Introdução

Óleos essenciais são produtos voláteis de órgãos vegetais e seus componentes são considerados agentes antimicrobianos mais importantes presentes em plantas. A atividade antimicrobiana é determinada pela composição e a concentração do óleo, o processamento e condições de estocagem. No geral, apresentam ação contra bactérias Gram positivas e Gram negativas e ainda sobre leveduras e fungos filamentosos (HAMMER, 1999).

O óleo essencial de *Mentha piperita* (família Lamiaceae) é obtido das folhas frescas, cujos compostos majoritários são o mentol e a mentona. É usado no tratamento de problemas do trato respiratório e gastrointestinal, apresentam ação antimicrobiana, espasmolítica e facilita a digestão (SIMÕES e SPITZER, 2000).

Syzygium aromaticum (família Myrtaceae) é um óleo essencial extraído do Cravo-da-Índia, obtido do botão floral seco ou das folhas frescas e seu principal componente é o eugenol, um composto fenólico que apresenta um potencial bactericida, fungicida e nematocida (DA GRAÇA CARDOSO, 2007).

O *Origanum majorana* (família Labiatae), cujos compostos majoritários são cis-sabineno hidratado e terpineol-4. Tradicionalmente, as folhas de manjerona são usadas para curar insônia, gastrite, asma e nervosismo. Atualmente, o isolamento do óleo volátil e identificação de seus componentes têm sido área de foco dos pesquisadores (VASUDEVA, 2015).

O presente estudo tem o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Mentha piperita* (Hortelã pimenta), *Syzygium aromaticum* (Cravo-da-índia) e *Origanum majorana* (Manjerona).

Materiais e métodos

Obtenção dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram adquiridos comercialmente da Ferquima Indústria e Comércio LTDA, Vargem Grande Paulista-SP.

Ensaio de atividade antibacteriana e antifúngica

Micro-organismos

A atividade antibacteriana e antifúngica foi avaliada utilizando-se as cepas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6623, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida tropicalis* ATCC 28707.

Padronização da suspensão microbiana

A suspensão microbiana foi padronizada com a escala 0,5 McFarland. As bactérias foram semeadas em Caldo Müller-Hinton (CMH) e incubadas durante 18-24h e as leveduras semeadas em Caldo Sabouraud Dextrose por 48-72 h. Após o crescimento a suspensão microbiana foi diluída em solução salina estéril (0,85% NaCl) até turbidez equivalente a escala 0,5 McFarland (aproximadamente 1 a 2×10^8 UFC/mL para bactérias e 1 a 5×10^6 UFC/mL para leveduras).

Concentração inibitória mínima (CIM) – Microdiluição em caldo de acordo com M07-A9 (2012) e M27-A3 (2008) CLSI

Uma solução estoque dos óleos foi preparada utilizando-se meio de cultura adequado como solvente, para bactérias CMH e para fungos o meio RPMI-1640 com 0,05% de vermelho de fenol e suplementado com 10% glicose. A partir da solução estoque, preparou-se solução teste de 8mg/ml. 100 µL de meio foi adicionado em cada poço de uma placa de 96 poços contendo 100 µL do meio apropriado e diluições seriadas foram realizadas obtendo-seas concentrações: 4000; 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 uL/mL. Também foram realizados controles do inóculo, da droga e do meio de cultura.

A seguir adicionou-se a suspensão padronizada de bactérias nos poços teste e também no controle do inóculo, e incubou-se a 37 ± 2 °C durante 18 a 24 h. O CIM (menor concentração da droga capaz de inibir o crescimento microbiano in vitro) foi evidenciado pela ausência de turvação.

Para *Candida* spp. a incubação foi realizada a 35 ± 2 °C durante 48 a 72 h. O crescimento microbiano foi observado pela presença de turvação e/ou alteração da cor.

Concentração bactericida (CBM)/ fungicida mínima (CFM)

Para determinar CFM e CBM, uma porção do meio de cultura dos poços onde o CIM foi determinado e das concentrações superiores foram plaqueadas em Ágar Müller-Hinton para bactéria, ou Ágar Sabouraud dextrose para leveduras. As placas foram incubadas a 37 ± 2 °C por 24 e 48 h, respectivamente. A menor concentração do extrato na qual não houve crescimento de micro-organismos ou o crescimento de apenas uma colônia foi considerada como CBM/CFM.

Resultados e Discussão

O *Syzygium aromaticum* apresentou maior atividade em relação a *Mentha piperita* e ao *Origanum majorana*, tanto no que se refere aos fungos quanto as bactérias, como apresentado nas tabelas 1 e 2 os valores de CIM, CFM E CBM.

Tabela 1. Valores de CIM e CFM apresentados pelos óleos: *Mentha piperita*, *Origanum majorana* e *Syzygium aromaticum*, frente às três espécies de cândidas: *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*.

	<i>C. albicans</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. parapsilosis</i>	
	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)
<i>M. piperita</i>	>4000	>4000	4000	4000	>4000	>4000
<i>O. majorana</i>	>4000	>4000	4000	4000	>4000	>4000
<i>S. aromaticum</i>	500	1000	500	1000	500	1000

Tabela 2. Valores de CIM e CBM apresentados pelos óleos: *Mentha piperita*, *Origanum majorana* e *Syzygium aromaticum*, frente as quatro bacterias: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

	<i>E. coli</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
<i>M. piperita</i>	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000
<i>O. majorana</i>	>4000	>4000	4000	4000	4000	>4000	>4000	>4000
<i>S. aromaticum</i>	2000	2000	>4000	>4000	2000	2000	4000	>4000

A partir dos valores de CIM os óleos essenciais podem ser classificados como inibidores fortes CIM até 500µg/mL, inibidores moderados com CIM entre 600 µg/mL e 1.500µg/mL e inibidores fracos com CIM acima de 1.600µg/mL (Aligiannis, 2001). Dessa forma em relação às espécies de cândidas testadas o *Syzygium aromaticum* se comportou como um inibidor forte e a *Mentha piperita* e o *Origanum majorana* como inibidores fracos. No que diz respeito às bactérias testadas todos os óleos apresentaram CIM acima de 1.600µg/mL sendo assim inibidores fracos.

Conclusões

Conclui-se, que o óleo essencial do *Syzygium aromaticum* foi mais ativo contra as espécies de cândida tendo resultados que o classificam como forte inibidor, já a *Mentha piperita* e o *Origanum majorana* não apresentaram atividade relevante frente a estes microrganismos. Nenhum dos óleos estudados apresentou bons resultados frente às bactérias testadas.

Agradecimentos

Ao Laboratório de microbiologia aplicada ao desenvolvimento de fármacos pelo apoio.

Referências

ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.

DA GRAÇA CARDOSO, Maria et al. Avaliação do potencial fungitóxico do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr & Perry (cravo-da-índia). **Tecno-Lógica**, v. 11, n. 1, p. 11-14, 2007.

HAMMER, Katherine A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of applied microbiology**, v. 86, n. 6, p. 985-990, 1999.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES C.M.O. et al **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. Ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Universidade Federal de Santa Catarina, p. 394-412, 2000.

VASUDEVA, Neer et al. *Origanum majorana* L.-Phyto-pharmacological review. 2015.