

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS MEDICINAIS

Kassia Vanessa Navarro Geromini¹
 Fernando Brito Roratto¹
 Fabio Gomes Ferreira²
 Polyana Barros Polido²
 Silvia Graciele Hülse de Souza³
 Juliana Silveira do Valle³
 Nelson Barros Colauto³
 Giani Andrea Linde^{3*}

GEROMINI, K. V. N.; RORATTO, F. B.; FERREIRA, F. G.; POLIDO, P. P.; SOUZA, S. G. H.; VALLE, J. S.; COLAUTO, N. B.; LINDE, G. A. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas medicinais. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, Umuarama, v. 15, n. 2, p. 127-131, jul./dez. 2012.

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Lippia alba* (erva-cidreira-brasileira), *Mentha piperita* (hortelã-pimenta), *Ocimum gratissimum* (alfavaca-cravo) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim) para *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os óleos essenciais foram obtidos de folhas por hidrodestilação. O rendimento de extração do óleo em mL kg⁻¹ foi de 1,5; 1,9; 2,0 e 2,3 para *L. alba*; *M. piperita*; *O. gratissimum* e *R. officinalis*, respectivamente. Os micro-organismos foram padronizados a 0,5 na escala McFarland e crescidos em ágar Mueller-Hinton. Discos de papel embebidos nos óleos essenciais foram posicionados na superfície do meio de cultivo e os halos de inibição do crescimento foram medidos. Os óleos essenciais, principalmente de *L. alba* e *O. gratissimum*, demonstraram alto potencial inibitório sobre o crescimento dos micro-organismos avaliados, com exceção de *P. aeruginosa* que apresentou alta resistência à presença dos óleos essenciais.

PALAVRAS-CHAVE: Antimicrobiano; Óleo essencial; Plantas medicinais.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF MEDICINAL PLANT ESSENTIAL OILS

ABSTRACT: In the present investigation, antimicrobial activity of four different plant essential oils - *Lippia alba*, *Mentha piperita*, *Ocimum gratissimum* and *Rosmarinus officinalis* - have been evaluated against *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The essential oils were obtained from leaves by hydrodistillation. The yield of oil extraction in mL kg⁻¹ was 1.5, 1.9, 2.0 and 2.3 for *L. alba*, *M. piperita*, *O. gratissimum* and *R. officinalis*, respectively. The microorganisms were standardized at 0.5 in the McFarland scale and grown in Mueller-Hinton agar. Paper discs soaked in the essential oils were placed on the surface of the culture medium and the growth inhibition zones were measured. The essential oils, especially *L. alba* and *O. gratissimum*, showed high inhibitory potential on microorganisms, except for *P. aeruginosa*, which showed high resistance to the presence of essential oils.

KEYWORDS: Antimicrobial; Essential oil; Medicinal plants.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS MEDICINALES

RESUMEN: El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Lippia alba* (lemongrass-brasileña), *Mentha piperita* (menta), *Ocimum gratissimum* (albahaca, clavo de olor) y *Rosmarinus officinalis* (romero) para el control de *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los aceites esenciales se obtuvieron a partir de hojas por hidrodestilación. El rendimiento de la extracción de aceite esencial en mL kg⁻¹ fue de 1.5, 1.9, 2.0 y 2.3 para *L. alba*, *M. piperita*, *O. gratissimum* y *R. officinalis*, respectivamente. Los microorganismos fueron estandarizados a 0.5 en la escala de McFarland y cultivados en agar Mueller-Hinton. Discos de papel empapados en los aceites fueron colocados en la superficie del medio de cultivo y se midieron los halos de inhibición del crecimiento. Los aceites esenciales, especialmente de *L. alba* y *O. gratissimum*, mostraron alto potencial inibitorio sobre el crecimiento de los microorganismos, excepto para *P. aeruginosa*, que mostró alta resistencia a la presencia de aceites esenciales.

PALABRAS CLAVE: Antimicrobiano; Aceite esencial; Plantas medicinales.

¹Acadêmico de Farmácia, bolsistas de iniciação científica, Laboratório de Biologia Molecular, Universidade Paranaense, Praça Mascarenhas de Moraes, s/n, CP 224, 87502-210, Umuarama, PR.

²Mestrandos em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Instituto de Ciências Exatas, Agrárias, Tecnológicas e Geociências - Universidade Paranaense.

³Professor Titular do Programa de Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Laboratório de Biologia Molecular, Universidade Paranaense, Praça Mascarenhas de Moraes, s/n, CP 224, 87502-210, Umuarama - PR.

*Autor para correspondência: gianilinde@unipar.br.

Introdução

Os óleos essenciais, também chamados de óleos voláteis ou etéreos, são líquidos aromáticos oleosos obtidos de material vegetal como flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, madeira, frutos e raízes (GUENTHER, 1948). Têm sido descritos como antibacterianos, antifúngicos, antivirais, antioxidantes e inseticidas. Estima-se que cerca de 3000 óleos essenciais sejam conhecidos, dos quais aproximadamente 300 são comercialmente importantes (BRAAK; LEIJTEN, 1994). As principais aplicações destes óleos têm sido na conservação de alimentos, na aromaterapia e na indústria de perfumaria (BURT, 2004). O uso de óleos essenciais para o controle de micro-organismos vem sendo ampliado devido principalmente à busca por substâncias alternativas para o controle de micro-organismos resistentes a antibióticos (ACOSTA et al., 2003). A disseminação de patógenos resistentes aos antibióticos é uma das mais sérias ameaças ao tratamento bem sucedido de doenças microbianas (STEWART; COSTERTON, 2001).

Lippia alba (Mill.) N. E. Br. ex Britton & P. Wilson (erva-cidreira-brasileira), *Mentha piperita* L. (hortelã-pimenta), *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca-cravo) e *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) são espécies conhecidas e utilizadas no Brasil (BURT, 2004). Apesar da importância dessas plantas para o uso tradicional, poucos trabalhos avaliaram a atividade antimicrobiana de seus óleos essenciais contra micro-organismos patogênicos. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *L. alba*, *M. piperita*, *O. gratissimum* e *R. officinalis* em *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados obtidos neste trabalho poderão subsidiar futuros estudos de plantas brasileiras com potencial uso no controle de micro-organismos de interesse humano e veterinário.

Materiais e Métodos

Material vegetal

Folhas de *L. alba*, *M. piperita*, *O. gratissimum* e *R. officinalis* foram coletadas às 9 h da manhã no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Paranaense – Umuarama -PR, nos meses de março à maio. As sujidades foram removidas em água corrente, o excesso de água removido, e em seguida o material foi armazenado em sacos de polipropileno a -20 °C. Para a obtenção do óleo essencial, as folhas (100 g) foram descongeladas, cortadas e misturadas em balão de vidro (2 L) com 1 L de água. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação em aparelho de Clevenger durante 1 h e 30 min. O óleo obtido foi armazenado a -20 °C e a água residual congelada removida. O rendimento foi determinado considerando o volume de óleo obtido (mL) a cada 1000 g de material vegetal fresco.

Atividade antimicrobiana

Foram utilizados *C. albicans*, *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, provenientes do Laboratório de Microbiologia da Universidade Paranaense, padronizados a 0,5 da escala McFarland (BIER, 1994), as quais foram distribuídos uni-

formemente em ágar Mueller-Hinton. Discos de papel embebidos nos óleos essenciais foram posicionados na superfície do meio de cultivo. Como controle positivo foram utilizados discos contendo benzilpenicilina G 10 UI para *P. aeruginosa* e *S. aureus*; tetraciclina (30 µg/disco) para *E. coli*, e nistatina 100 UI para *C. albicans*. Como controle negativo foram utilizados discos embebidos em óleo mineral. O crescimento microbiano foi realizado a 35 °C por 24 h. Após esse período, os halos de inibição do crescimento foram medidos em quatro pontos equidistantes medidos com auxílio de paquímetro. Todos os experimentos foram realizados em quintuplicata. Os dados foram avaliados pela análise de variância e a diferença entre as médias foi determinada pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$).

Resultados e Discussão

O rendimento de extração do óleo em mL kg⁻¹ foi de 1,5; 1,9; 2,0 e 2,3 para *L. alba*; *M. piperita*; *O. gratissimum* e *R. officinalis*, respectivamente. Na literatura são citados rendimentos de extração de óleo essencial, variando de 1,5 a 48,4 mL kg⁻¹ para *L. alba* (CASTRO; MING; MARQUES, 2002; AQUINO, et al., 2010) de 0,9 a 39,0 mL kg⁻¹ para *M. piperita* (MCKAY; BLUMBERG, 2006), de 2,1 mL kg⁻¹ para *O. gratissimum* (CORTEZ et al., 1998) e de 0,5 a 20,0 mL kg⁻¹ para *R. officinalis* (PORTE; GODOY, 2001).

A concentração de óleos essenciais na planta é influenciada principalmente por fatores genéticos. Segundo Mahmoud e Croteau (2001) a indução de genes da biossíntese de monoterpenos é realizada em tricomas glandulares em desenvolvimento, e a acumulação de óleo é controlada em nível transcricional (MCCONKEY; GERSHENZON; CROTEAU, 2000). Outros fatores podem afetar a produção desses metabólitos secundários (MATTOS; INNECCO, 2002). Os metabólitos secundários funcionam como uma interface química entre as plantas e o ambiente. Desse modo, fatores ambientais podem redirecionar a rota de síntese e, conseqüentemente, alterar a produção e composição química dos óleos essenciais. Dentre esses fatores, estão as interações planta-micro-organismo, planta-inseto, e planta-planta, a idade, e estágio de desenvolvimento da planta, e fatores abióticos como luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, época e, horário de coleta, todos ocorrendo ao mesmo tempo, e de forma correlacionada (CARVALHO FILHO et al., 2006; ROSSATO et al., 2006; MORAIS, 2009).

Além dos fatores genéticos e de produção da planta, o processamento também pode alterar a composição do óleo. Barbosa et al. (2006) relataram que temperaturas de até 80 °C, utilizadas no processo de secagem de folhas de *L. alba*, reduziram, entre 12% e 17%, a quantidade de óleo essencial em relação às obtidas de folhas frescas. Assim, em face da alta variabilidade do rendimento de obtenção do óleo essencial, torna-se difícil a comparação de valores de rendimento de extração.

Atividade antimicrobiana

A Tabela 1 apresenta a atividade antimicrobiana (halo de inibição do crescimento em mm) de diferentes micro-organismos na presença dos óleos essenciais de *L. alba*, *M. piperita*, *O. gratissimum* ou *R. officinalis* e dos controles

positivo e negativo, antibióticos e óleo mineral, respectivamente.

Para *C. albicans*, os óleos essenciais de *L. alba* e *O. gratissimum* apresentaram halos de inibição entre 1,5 e 1,1 vezes maior que o controle positivo com nistatina (Tabela 1). Araújo et al. (2004), trabalhando com óleos essenciais de *L. alba*, verificaram atividade antimicrobiana 43% inferior ao controle cetoconazol (80 mg mL⁻¹) para *C. albicans*. Já Matasyoh et al. (2008) verificaram atividade do óleo essencial de *O. gratissimum* equivalente ao controle positivo para *C. albicans*. Os resultados obtidos em nosso trabalho indicam alta atividade antifúngica do óleo essencial de *L. alba* e *O. gratissimum* com halos de inibição superiores aos citados na literatura acima, demonstrando o potencial do óleo essencial dessas plantas para o controle de *C. albicans*.

Tabela 1: Medida do halo (mm) de inibição do crescimento de diferentes micro-organismos na presença de óleos essenciais.

Tratamentos*	Halo de inibição de crescimento (mm)			
	<i>Candida albicans</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Lippia alba</i>	50,0 a	20,0 b	22,0 c	0,0
<i>Mentha piperita</i>	17,0 c	16,0 c	18,0 d	11,0 c
<i>Ocimum gratissimum</i>	42,0 b	30,0 a	28,0 b	15,0 b
<i>Rosmarinus officinalis</i>	20,0 c	13,0 c	16,0 d	10,0 c
Tetraciclina**	-	28,5 a	-	-
Penicilina**	-	-	40,3 a	23,0 a
Nistatina**	20,0 c	-	-	-
Óleo mineral***	0,0	0,0	0,0	0,0

* As letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste de Scott-Knott.

**Controle positivo tetraciclina (30 µg/disco) para *E. coli*, benzilpenicilina (10 UI) para *S. aureus* e *P. aeruginosa* e nistatina (100 UI) para *C. albicans*.

***Controle negativo: discos embebidos em óleo mineral.

Os óleos de *M. piperita* e *R. officinalis* apresentaram halos intermediários aos obtidos para os respectivos controles positivo. Segundo Işcan et al. (2002), o óleo de *M. piperita* apresentou inibição sobre *P. aeruginosa* e *S. aureus*, já o óleo de *R. officinalis* produziu nenhuma ou reduzida inibição sobre *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli* (PORTE; GODOY, 2001). Contudo os resultados obtidos em nosso trabalho demonstram que o óleo essencial de *R. officinalis* apresenta atividade antimicrobiana sobre *C. albicans*, *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

O mecanismo de ação dos óleos essenciais tem sido bastante discutido (BONA et al., 2012) devido à quantidade e variedade dos compostos químicos presentes, o que dificulta a atribuição de um mecanismo de ação específico para a atividade antimicrobiana (CARSON; MEE; RILEY, 2002). Dorman e Deans (2000) relataram que a maioria dos óleos essenciais provavelmente exercem efeito antimicrobiano, afetando a estrutura da parede celular bacteriana, desnaturando e coagulando proteínas. Podem também alterar a permeabilidade da membrana plasmática, causando a interrupção de processos vitais da célula, como transporte de elétrons, translocação de proteínas, fosforilação e outras reações, resultando em perda do controle quimiosmótico, levando a morte celular.

Para *E. coli*, o maior halo de inibição foi obtido com óleo de *O. gratissimum*, seguido por *L. alba* com inibição do crescimento similares ao controle com tetraciclina (Tabela 1). Em relação ao controle benzilpenicilina, os óleos essenciais de *L. alba* e *O. gratissimum* apresentaram valores intermediários de atividade antimicrobiana sobre *S. aureus*. A alteração da permeabilidade da membrana e das paredes celulares das bactérias se deve ao caráter lipofílico dos óleos essenciais que se acumulam nas membranas. Bactérias gram-negativas possuem membrana externa rica em lipopolissacarídeos, formando uma superfície hidrofílica. Esse caráter hidrofílico cria uma barreira à permeabilidade das substâncias hidrofóbicas como óleos essenciais, sendo uma provável explicação para a resistência de bactérias Gram-negativas aos óleos essenciais (DORMAN; DEANS, 2000). O bacilo Gram-negativo *P. aeruginosa* possui um mecanismo de defesa complexo e apresenta baixa sensibilidade à maioria dos antibióticos (PALLERONI, 2010). Porém, em nosso trabalho seu crescimento foi inibido pelos óleos de *O. gratissimum*, *M. piperita* e *R. officinalis*.

Já para *P. aeruginosa* os óleos essenciais apresentaram reduzida inibição do crescimento em relação ao controle penicilina. Dessa maneira, todos os óleos essenciais, principalmente os de *L. alba* e *O. gratissimum*, demonstraram alto potencial inibitório sobre os micro-organismos com exceção de *P. aeruginosa*, que apresentou alta resistência à presença dos óleos essenciais. Estudos futuros devem ser feitos para melhorar a quantificação e compreensão dos mecanismos de ação antimicrobiana desses óleos. A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais avaliados pode abrir perspectivas para o desenvolvimento de fitoterápicos para o controle de micro-organismos com potencial aplicação nas indústrias químicas, farmacêuticas e conservação de alimentos.

Conclusões

Os óleos essenciais, principalmente de *L. alba* e *O. gratissimum*, demonstram alto potencial inibitório sobre *C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus*, com exceção de *P. aeruginosa*, que apresenta resistência à presença desses óleos essenciais.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação Araucária pela bolsa PEBIC concedida, à Universidade Paranaense pela bolsa PIBIC concedida e à CAPES pelas bolsas concedidas.

Referências

- ACOSTA, M. et al. Composición química de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. var *basilicum*, O. *basilicum* L. var *purpurensceus*, O. *gratissimum* L., y O. *tenuiflorum* L., y su efecto antimicrobiano sobre bacterias multirresistentes de origen nosocomial. **Revista de la Facultad de Farmacia**, Mérida, v. 45, n. 1, p. 19-24, 2003.
- AQUINO, L. C. L. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de erva-cidreira e manjeriço frente a bactérias de carnes bovinas. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 21, n. 4, p. 529-535, out./dez. 2010.
- ARAÚJO, J. C. L. V. et al. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 33, n. 1, p. 55-64, 2004.
- BARBOSA, F. F. et al. Influência da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1221-1225, 2006.
- BIER, O. **Microbiologia e imunologia**. 30. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1994. 1234 p.
- BONA, T. D. M. M. et al. Óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta no controle de *Salmonella*, *Eimeria* e *Clostridium* em frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 5, p. 411-418, 2012.
- BRAAK, S. A. A. J.; LEIJTEN, G. C. J. J. **Essential oils and oleoresins**: a survey in the Netherlands and other major markets in the European union. 1994. 116 f. Monografia (CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries) - Wageningen University, Rotterdam, 1994.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.
- CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, 2002.
- CARVALHO FILHO, J. L. S. et al. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 24-30, 2006.
- CASTRO, D. M.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M. Composição fitoquímica dos óleos essenciais de folhas de *Lippia alba* (Mill). N.E.Br em diferentes épocas de colheita e partes do ramo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 4, n. 2, p. 75-79, 2002.
- CORTEZ, D. A. G. et al. Análise do óleo essencial da alfavaca (*Ocimum gratissimum* L. (Labiatae). **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, Umuarama, v. 2, n. 2, p. 125-127, 1998.
- DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.
- GUENTHER, E. **The essential oils**. NewYork: D. Van Nostrand, 1948. 427 p. v. 1
- IŞCAN, G. et al. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 14, p. 3943-3946, 2002.
- MAHMOUD, S. S.; CROTEAU, R. B. Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 15, p. 8915-8920, 2001.
- MATASYOH, L. G. et al. Antimicrobial activity of essential oils of *Ocimum gratissimum* L. from different populations of Kenya. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, Nigeria, v. 5, n. 2, p. 187-193, 2008.
- MATTOS, S. H.; INNECCO, R. Idade ideal de corte da *Mentha arvensis* L. como produtora de óleo essencial e mentol para o Estado do Ceará, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 5, n. 1, p. 15-18, 2002.
- MCCONKEY, M. E.; GERSHENZON, J.; CROTEAU, R. B. Developmental regulation of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of peppermint. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 122, n. 1, p. 215-223, 2000.
- MCKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). **Phytotherapy Research**, London, v. 20, n. 8, p. 619-633, 2006.
- MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 27, n. 2, p. S4050-S4063, 2009.
- PALLERONI, N. J. The *pseudomonas* story. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 12, n. 6, p. 1377-1383, 2010.
- PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 193-210, 2001.
- ROSSATO, M. et al. Avaliação do óleo essencial de *Aloysia sellowii* (Briquet) moldenke (Verbenaceae) do Sul do Brasil.

Química Nova, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 200-202, 2006.

STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **The Lancet**, New York, v. 358, n. 9276, p. 135-138, 2001.