

AVALIAÇÃO SAZONAL DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia thymoides*

André Luís de S. Oliveira¹; Angélica Maria Lucchese²

1. Bolsista FAPESB, Graduando em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, email: andre_iso@hotmail.com
2. Orientador, Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, email: angelica.lucchese@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: *Lippia thymoides*, óleo, atividade antimicrobiana.

INTRODUÇÃO

O gênero *Lippia*, o segundo maior da família Verbenaceae, possui aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores em três centros de dispersão, sendo o Brasil o maior deles, com 111 espécies, onde se destacam por seu aspecto chamativo no período da floração e por seu aroma forte e geralmente agradável (PASCUAL, 2001; TERBLANCHÉ; KORNELIUS, 1996; GOMES, 2009).

Os óleos essenciais extraídos de plantas deste gênero têm revelado um perfil químico semelhante, com a presença frequente dos componentes: limoneno, β -cariofileno, p-cimeno, cânfora, linalol, α -pineno e timol (GOMES, 2009). Santos & Innecco (2005) afirmam que a presença, no óleo essencial, de sesquiterpenos e monoterpenos, monocíclicos ou acíclicos, característicos do gênero *Lippia*, que fornece as propriedades fitoterapêuticas das espécies.

O óleo essencial extraído das folhas de *Lippia thymoides*, teve sua composição química e atividade antimicrobiana avaliada por Castro (2005) detectando que pelo método qualitativo de difusão em disco, este óleo rico em compostos mono e sesquiterpênicos, inibiu o crescimento microbiano de *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, dois microorganismos frequentemente responsáveis por infecções respiratórias, de pele, do trato urinário e problemas bucais (PINTO, 2008).

Embora seja determinada geneticamente, a composição química dos óleos essenciais pode variar em função de fatores ambientais como a umidade do ar, disponibilidade hídrica, condições de solo, intensidade luminosa, temperatura e período de coleta (VIDO, 2009) e por fim alterar seu rendimento e atividade biológica.

Portanto, considerando que avanços no sentido de compreender a influência dos fatores ambientais na regulação de biossíntese de metabólitos secundários, podem contribuir para um aumento na produção de compostos de interesse nestas espécies utilizadas popularmente, o presente estudo tem como objetivo avaliar a variabilidade sazonal da composição química e atividade antimicrobiana dos óleos essenciais da espécie *L. thymoides*.

METODOLOGIA

As plantas, coletadas no campus da UEFS no final do primeiro mês de cada estação (nos dias 28/04/2009; 24/07/2009; 28/10/2009 e 28/01/2010), foram secas à temperatura ambiente ao abrigo da luz, até peso constante, para estabilização do material. As folhas foram, então, separadas do caule e pulverizadas em moinho de facas. Uma exsiccata da espécie foi depositada no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS) sob o nº 77554 e identificada pela Prof^a. Dr^a. Tânia Regina Silva.

Após a pulverização, as folhas do material foram submetidas à hidrodestilação utilizando aparelho de Clevenger, por três horas, para extração do óleo essencial que foi secado com sulfato de sódio anidro e armazenado em baixa temperatura.

A análise da composição química destes óleos essenciais foi realizada por cromatografia gasosa, empregando-se cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC-2010, com

detector de ionização de chama Varian, modelo CP-3380, e cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas Shimadzu, modelo GCMS-QP2010, seguindo a metodologia de Adams (2007). Os componentes do óleo essencial foram identificados com base no índice de Kovats, determinado com base numa série homóloga de n-alcenos (C₈-C₂₄) injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras e nos modelos de fragmentação dos espectros de massa, sendo ambos comparados com dados da literatura.

Os ensaios para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram realizados em placa de microdiluição com 96 poços, variando a diluição de 8,43 a 0,004 mg.mL⁻¹. O óleo foi solubilizado em Tween 80 a 10% para melhor dispersão do óleo e, em seguida, esterilizados por filtração em membrana de acetato celulose (0,22 µm).

Os micro-organismos testes (*Escherichia coli* CCMB 261, resistente à Sulfonamida e sensível à Trimetoprima; *Staphylococcus aureus* CCMB 262, resistente à Estreptomicina e dihidroestreptomicina; *Pseudomonas aeruginosa* CCMB 268; *Salmonella cholerasuis* CCMB 281; *Bacillus cereus* CCMB 282 e *Micrococcus luteus* CCMB 283, e a levedura *Candida albicans* CCMB 286, resistente à Fluconazol e Anfotericina B) foram suspensos em solução salina 0,45%. Ao final obteve-se suspensões de trabalho com concentração de 1,5 x 10⁶ UFC.mL⁻¹ para as bactérias e, 5,0 x 10⁵ UFC.mL⁻¹ para a levedura. Foram retirados 10,0 µL dessas suspensões e adicionados nesses poços. Após incubação das placas foram acrescentados a cada poço 30 µL de resazurina e, após 3 horas de reincubação, o crescimento microbiano foi indicado pela presença da coloração rosa nos poços. A CIM do antibiótico cloranfenicol foi determinada em paralelo ao experimento. Foram incluídas como controle a esterilidade do meio e das amostras, a viabilidade dos microrganismos testes e a possível atividade antimicrobiana do Tween 80. Todos os testes e controles foram realizados em triplicata.

A Concentração Bactericida/Fungicida Mínima também foi determinada, retirando-se 5,0 µL dos poços onde houve inibição do crescimento microbiano e transferindo para uma placa de Petri com meio ágar Mueller Hinton geleificado. Após reincubação, considerou-se como Concentração Microbicida Mínima a menor concentração da amostra onde não ocorreu crescimento microbiano.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1. Concentrações Inibitórias Mínimas e Concentrações Bactericidas/Fungicidas Mínimas dos óleos essenciais de *L. thymoides*

Amostra	Concentração Mínima (mg.mL ⁻¹)													
	<i>E. coli</i> CCMB 261		<i>S. aureus</i> CCMB 262		<i>P. aeruginosa</i> CCMB 268		<i>S. cholerasuis</i> CCMB 281		<i>B. cereus</i> CCMB 282		<i>M. luteus</i> CCMB 283		<i>C. albicans</i> CCMB 286	
	CIM	CIM	CBM	CIM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CFM
Outono	R	< 0,004	0,53	R	8,43	>8,43	R	0,03	>8,43	< 0,004	4,21			
Inverno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	< 0,004	>8,43		
Primavera	R	< 0,004	0,26	R	R	-	R	0,07	>8,43	< 0,004	4,21			
Verão	R	< 0,004	>8,43	R	R	-	R	0,03	>8,43	< 0,004	>8,43			
Cloran.	0,675	0,003	-	0,084	0,005	-	0,005	0,003	-	-	-			

-: Não testado. **R**: Resistente na concentração testada. **Cloran.**: Cloranfenicol.

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), cujo resultado é apresentado na Tabela 1, revela que todas as amostras apresentaram atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento microbiano de, no mínimo, dois micro-organismos avaliados. As amostras apresentaram variações de CIMs entre as diferentes épocas de coleta, sendo ativas contra a levedura *C. albicans* CCMB 286 e as bactérias *S. aureus* CCMB 262, *S. cholerasuis*

CCMB 281 e *M. luteus* CCMB 283. Essa atividade pode ser atribuída ao cariofileno, componente majoritário (TABELA 2) conhecido por sua atividade antimicrobiana (PASCUAL, 2001), embora efeitos sinérgicos de outros constituintes não possam ser descartados.

A bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* CCMB 262 e a levedura *Candida albicans* CCMB 286 foram os micro-organismos mais suscetíveis aos óleos essenciais testados, visto que as CIMs das amostras foram inferiores às concentrações necessárias para inibir os demais micro-organismos. Além disso, as CIMs dos óleos essenciais, frente a *S. aureus* CCMB 262, são comparáveis a CIM obtida pelo antibiótico Cloranfenicol, contra este mesmo micro-organismo.

A maior resistência das bactérias Gram-negativas à ação de óleos essenciais já é descrita na literatura como decorrente da grande complexidade da dupla membrana apresentada por estes microrganismos, a qual limita a difusão de compostos (SILVA et al., 2010), bem como devido ao mecanismo especializado que possuem para expulsar essas substâncias estranhas, chamado de bomba de efluxo, prevenindo o acúmulo do agente antimicrobiano no interior da célula (RODRIGUES, 2008).

Dentre as amostras testadas, a coletada no outono, foi a única a inibir o crescimento de um micro-organismo Gram-negativo, a bactéria *S. choleraesuis* CCMB 281. Esse resultado se revela promissor, tendo em vista que em estudos realizados com plantas medicinais, a maioria dos óleos essenciais mostram-se ativos contra cepas de bactérias Gram-positivas (ARAÚJO et al., 2004; ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2007); além de demonstrar que o componente Z- α -bisaboleno (1,12%), identificado exclusivamente nesta amostra, deve possuir capacidade de atravessar a membrana externa das bactérias Gram-negativas.

Tabela 2. Constituintes químicos majoritários do óleo essencial de *Lippia thymoides*

Composto	IK Lit.	Outono		Inverno		Primavera		Verão	
		IK C	%	IK C	%	IK C	%	IK C	%
Canfeno	946	953	5,44	953	2,64	954	5,66	943	3,25
Limoneno	1029	1032	3,63	1032	2,42	1032	3,75	1032	1,67
Eucaliptol	1031	1034	3,04	1034	3,88	1034	4,50	1034	1,86
Cânfora	1146	1146	8,61	1146	4,92	1146	3,22	1146	4,52
Borneol	1169	1168	5,33	1168	4,45	1168	7,36	1168	6,46
Cariofileno	1419	1422	17,22	1423	26,27	1423	21,20	1423	19,28
α -Cariofileno	1454	1457	5,05	1456	3,99	1457	3,06	1457	5,48
Germacreno D	1485	1483	4,80	1483	6,18	1484	4,72	1484	5,39
Calameneno	1529	1525	4,30	1525	3,53	1526	4,75	1526	3,83
Total de identificados %			74,96		82,48		81,43		70,77
Não identificados %			25,04		17,52		18,57		29,23

IK Lit. = índice de Kovats da literatura; IK C = índice de Kovats calculado; % = porcentagem relativa.

As amostras da primavera e verão apresentaram o mesmo perfil de atividade antimicrobiana, no entanto, com a segunda obteve-se menor valor de CIM frente à *M. luteus* CCMB 283. A amostra do inverno, devido a quantidade insuficiente disponível, foi testada apenas contra a levedura *C. albicans* CCMB 286 e, assim como as outras três amostras, apresentou CIM menor do que as concentrações testadas.

O resultado da Concentração Bactericida/Fungicida Mínima revela que todas as amostras apresentaram concentração microbicida maior que a CIM. Verificou-se também

variação de CBM entre amostras que apresentaram mesmo espectro de ação antimicrobiana, como as amostras do outono e primavera que frente à bactéria *S. aureus* CCMB 262 foram bactericidas em concentrações de 0,53 e 0,26 mg.mL⁻¹, respectivamente, mas que diante da levedura *C. albicans* CCMB 286 tiveram mesma CFM (4,21 mg.mL⁻¹). A amostra do verão foi bacteriostática frente a todos os micro-organismos a que foi testada, constatando-se que a composição química deste óleo deve ter um déficit em componentes responsáveis pela ação bactericida.

Dessa forma, conclui-se que o óleo essencial dessa espécie inibe o crescimento microbiano, predominantemente, devido à uma ação bacteriostática/fungistática, ou seja, inibindo o crescimento e a duplicação mas sem provocar a destruição, podendo o micro-organismo voltar a crescer com a suspensão do agente (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2010).

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. *Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. 4. ed. Carol Stream: Allured, 2007.
- ARAÚJO, J. C. L. V. et al. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre micro-organismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. *Rev. Patol. Trop.* v. 33 (1). 55-64. jan-jun, 2004.
- BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. *Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica*. 11. ed. Porto Alegre: AMGH, 2010.
- ERNANDES, F. M. P. G; GARCIA-CRUZ, C. H. Atividade antimicrobiana de diversos óleos essenciais em micro-organismos isolados do meio ambiente. *B. CEPPA*, Curitiba v. 25, n. 2, p. 193-206 jul./dez. 2007.
- GOMES, S. V. F. *Desenvolvimento de método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para diferenciação de genótipos de Lippia gracilis Schauer*. 2009. 163 f. Dissertação (Mestrado) – Núcleo de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.
- PASCUAL, M. E. et. al. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 76, p.201-214, 2001.
- PINTO, C. P. *Atividade antimicrobiana e perfil químico de espécies do gênero Lippia do semi-árido da Bahia*. 2008. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana – Feira de Santana.
- RODRIGUES, V. D. *Atividade antimicrobiana de Lippia thymoides*. 2008. 62 f. Trabalho de conclusão de curso de Ciências Farmacêuticas – Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.
- SANTOS, M. R. A.; INNECCO, R. 2003. Influência de períodos de secagem de folhas no óleo essencial de erva-cidreira (quimiotipo limoneno-carvona). *Revista Ciência Agronômica*. 34: 5-11.
- SILVA, L. L. et al. Composição química, atividade antibacteriana *in vitro* e toxicidade em *Artemia salina* do óleo essencial das inflorescências de *Ocimum gratissimum* L., Lamiaceae. *Rev. Bras. Farmacogn.* 20(5): Out./Nov. 2010.
- TERBLANCHÉ, F. C.; KORNELIUS, G. Essential oil constituents of the genus Lippia (Verbenaceae) – A literature review. *Journal of Essential Oil Research*, 8: 471-485, 1996.
- VIDO, D. L. R. *Comparação da composição química e das atividades biológicas dos óleos essenciais de folhas de populações de Hedyosmum brasiliense Mart. ex Miq. provenientes da Serra do Mar e da Serra da Mantiqueira (Mata Atlântica)*. 2009. 92 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais) – Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente.