

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Lippia thymoides* Mart. & Schauer

André Luís de Santana Oliveira¹; Angélica Maria Lucchese²; Fabrcio Souza Silva³; Edna Dória Peralta⁴

1. Bolsista FAPESB, Graduando em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, email: andre_lso@hotmail.com
2. Orientador, Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, email: angelica.lucchese@gmail.com
3. Participante do projeto, Universidade Federal do Vale do São Francisco, email: fssilvafarma@gmail.com
4. Participante do projeto, Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, email: edna.peralta@gmail.com

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

INTRODUÇÃO

A região Nordeste do Brasil caracteriza-se por uma extensa área formada por fauna e flora típicas de climas secos e déficit hídrico. Nesta região semi-árida, a vegetação é basicamente composta por arbustos e apresenta cerca de 596 espécies diferentes, com destaque para espécies das famílias Caesalpinaceae, Mimosaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae e Cactaceae (PESSOA et al, 2006). Além disso, algumas espécies da família Verbenaceae também se concentram nessa região do Brasil, com ênfase no gênero *Lippia* que possui grande importância como condimento ou devido suas propriedades medicinais (PINTO, 2008).

Na medicina tradicional, infusões das partes aéreas de muitas dessas espécies são frequentemente utilizadas para problemas gastrointestinais e respiratórios, condições nervosas, hipertensão e náuseas (LINDE et al, 2010; SARRAZIN, 2012). Algumas espécies de *Lippia* têm mostrado atividades antimalárica, antiviral e citostática (PASCUAL et al, 2001), anti-histamínica e anticolinérgica (GÖRNEMANN et al, 2008); e outras são usadas como temperos alimentícios (SARRAZIN, 2012).

A espécie *Lippia thymoides* Mart. & Schauer que é conhecida popularmente como alecrim-do-mato, alecrim-de-vaqueiro ou alecrim-miúdo-de-cheiro e utilizada em banhos de descarrego na umbanda tem despertado o interesse de pesquisadores, além de ser promissora para a indústria farmacêutica e de defensivos, diante da atividade antimicrobiana de seus óleos essenciais e extratos, comprovadas cientificamente por testes qualitativos.

Tendo em vista a determinação do potencial antimicrobiano da espécie estudada como fonte para a descoberta de novos possíveis agentes terapêuticos no combate a infecções bacterianas e fúngicas, o objetivo do presente trabalho foi avaliar quantitativamente a atividade antimicrobiana, utilizando o método de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida/Fungicida Mínima (CBM/CFM), dos extratos e frações do caule e folhas da espécie *L. thymoides*.

METODOLOGIA

O material vegetal coletado no campus da UEFS foi seco à temperatura ambiente ao abrigo da luz, até peso constante, para estabilização do material. As folhas e caules foram, então, separados, pulverizados em moinho de facas e submetidos à extração por maceração com metanol, três vezes consecutivas, em recipientes de vidro.

Os extratos brutos foram concentrados em evaporadores rotatórios, sob pressão reduzida, em temperaturas relativamente baixas (40-42°C) e o resíduo de solvente foi retirado por evaporação em capela de exaustão. Os extratos brutos foram fracionados por partição

líquido-líquido, com solventes de polaridades crescentes, obtendo-se as frações em hexano, diclorometano e acetato de etila.

Os ensaios para determinação da CIM foram realizados em placa de microdiluição com 96 poços, em triplicata, com os extratos brutos e frações em hexano, diclorometano e acetato de etila dos caules e folhas; variando a concentração de 9,99 a 0,08 mg.mL⁻¹. Os extratos e frações foram solubilizados em Dimetilsulfóxido (DMSO) a 50% e, em seguida, esterilizados por filtração em membrana de acetato de 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) e CCMB 263 (resistente à Novobiocina); *Salmonella cholerasuis* CCMB 281; *Bacillus cereus* CCMB 282; *Micrococcus luteus* CCMB 283; *Candida albicans* CCMB 286 (resistente à Fluconazol e Anfotericina B) e *Candida parapsilosis* CCMB 288 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, 1,5 x 10⁵ UFC.mL⁻¹ para a levedura. Foram retirados 10 µL dessas suspensões e adicionados nesses poços. Após incubação das placas foram acrescentados a cada poço 30 µL de resazurina e, depois de 3 horas de reincubação, o crescimento microbiano foi indicado pela presença da coloração rosa nos poços. Foram incluídas como controle, a esterilidade do meio e das amostras e a viabilidade dos micro-organismos testes. Todos os testes e controles foram realizados em triplicata.

A Concentração Bactericida/Fungicida Mínima também foi determinada, retirando-se 5 µL dos poços onde houve inibição do crescimento microbiano e transferindo para uma placa de Petri com meio ágar Mueller Hinton. 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 e Bactericidas Mínimas dos extratos e frações de *L. thymoides* Mart. & Schauer

		Concentração Mínima (mg.mL ⁻¹)											
Órgão	Frações	<i>E. coli</i> CCMB 261		<i>S. aureus</i> CCMB 262		<i>S. aureus</i> CCMB 263		<i>S. cholerasuis</i> CCMB 281		<i>B. cereus</i> CCMB 282		<i>M. luteus</i> CCMB 283	
		CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Folha	Metanol (Bruto)	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	9,99	5,00	5,00	5,00	5,00
	Hexano	5,00	-	1,25	2,50	2,50	2,50	5,00	9,99	2,50	2,50	5,00	-
	Diclorometano	2,50	5,00	0,31	0,62	0,16	1,25	2,50	5,00	0,16	0,16	0,62	-
	Acetato de Etila	2,50	2,50	0,31	0,62	0,31	0,62	1,25	1,25	0,62	0,62	0,62	-
Caulo	Metanol (Bruto)	2,50	5,00	0,62	2,50	2,50	5,00	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	5,00
	Hexano	2,50	9,99	2,50	5,00	2,50	5,00	5,00	9,99	2,50	2,50	2,50	-
	Diclorometano	2,50	5,00	0,31	0,62	0,62	1,25	2,50	2,50	0,62	0,62	0,62	1,25
	Acetato de Etila	5,00	9,99	0,31	1,25	0,62	1,25	1,25	2,50	0,62	1,25	1,25	1,25

-: Bacteriostático nas concentrações testadas.

Todas as amostras apresentaram atividade antibacteriana, sendo mais ativas contra as bactérias Gram-positivas, especialmente as duas cepas de *S. aureus* e *B. cereus*. A menor concentração inibitória foi 0,16 mg.mL⁻¹, obtida com a fração diclorometano das folhas, frente a esses dois micro-organismos. Entre as amostras do caule, as menores concentrações inibitórias encontradas foram com as frações diclorometano e acetato de etila, frente aos mesmos micro-organismos (Tabela 1).

De forma geral, os extratos brutos apresentaram menor atividade em relação às suas frações, demonstrando que os constituintes combinados possuem efeitos antagônicos, reduzindo o potencial antimicrobiano da espécie. Com as frações diclorometano e acetato de etila obteve-se as melhores atividades. Pinto (2008) e Pascual et al (2001) afirmam que essa maior atividade antibacteriana das frações de polaridade intermediária é justificada pela presença de compostos como lignanas, flavonoides metoxilados, sesquiterpenos, lactonas, triterpenos e cumarinas, e que são comumente associados a atividade antimicrobiana de espécies do gênero *Lippia*.

A maior sensibilidade da bactéria *S. aureus* e *M. luteus* aos extratos manifesta um resultado promissor, uma vez que essas bactérias Gram-positivas estão frequentemente associadas a infecções de pele, podendo justificar a utilização da espécie na medicina popular como alternativa terapêutica no tratamento de afecções cutâneas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). A bactéria *B. cereus*, causadora de surtos de intoxicação alimentar, também apresentou alta suscetibilidade às amostras, revelando uma potencial aplicação clínica de *L. thymoides* Mart. & Schauer ainda desconhecida (GOMES et al, 2004).

A maior resistência das bactérias Gram-negativas à ação de extratos já é descrita na literatura como decorrente da grande complexidade da dupla membrana apresentada por estes micro-organismos, 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).

Entre os resultados da CBM destaca-se a alta suscetibilidade de *B. cereus* aos extratos e frações de *L. thymoides*, pois com todas as amostras testadas, a concentração bactericida foi semelhante a concentração inibitória. Em contrapartida, com a bactéria *M. luteus* apenas os extratos brutos e as frações em diclorometano e acetato de etila do caule provocaram a morte do micro-organismo.

Na tabela 2, estão descritos os resultados da atividade antimicrobiana frente às leveduras, na qual observa-se que a menor concentração inibitória foi 0,62 mg.mL⁻¹, obtida com a fração diclorometano frente a *C. parapsilosis*.

Tabela 2. Concentrações Inibitórias e Fungicidas Mínimas dos extratos e frações de *L. thymoides* Mart. & Schauer

		Concentração Mínima (mg.mL ⁻¹)			
Órgão	Frações	<i>C. albicans</i> CCMB 286		<i>C. parapsilosis</i> CCMB 262	
		CIM	CFM	CIM	CFM
Folha	Metanol (Bruto)	9,99	9,99	5,00	5,00
	Hexano	9,99	9,99	2,50	5,00
	Diclorometano	2,50	5,00	0,62	1,25
	Acetato de Etila	5,00	9,99	5,00	9,00
Caule	Metanol (Bruto)	< 9,99	-	9,99	9,99
	Hexano	9,99	9,99	2,50	5,00
	Diclorometano	9,99	9,99	5,00	9,99
	Acetato de Etila	5,00	9,99	5,00	5,00
DMSO					

-: Não avaliado.

As altas concentrações obtidas contrastam com as obtidas no teste de CIM com as bactérias. Esse resultado pode ser explicado pela presença e estrutura da parede celular das

leveduras que apresenta quitina e 1,3- β -glicano em sua morfologia, podendo dificultar a penetração do agente antimicrobiano (SELITRENNIKOFF, 2001 apud PINTO, 2008).

Diferente das bactérias, os extratos brutos apresentaram concentrações inibitórias semelhantes às frações, quando testadas frente as leveduras, constatando-se que a união dos constituintes, de forma geral, não apresentam efeitos antagônicos, nem sinérgicos contra estes micro-organismos. Destaca-se ainda o resultado do extrato bruto do caule que foi o único a não inibir o crescimento de um micro-organismo, nas faixas de concentrações testadas.

O resultado da CBM também revelou que os constituintes de *L. thymoides* tem pouco poder fungicida, sendo necessário altas concentrações para provocar a morte das leveduras.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que todas as amostras analisadas apresentaram atividade antimicrobiana, sendo mais ativas contra as bactérias Gram-positivas e com destaque para as frações de polaridade intermediária das folhas que apresentaram as menores concentrações inibitórias frente aos micro-organismos testados, inclusive em comparação com os extratos brutos. Os resultados fornecem evidências científicas para o uso da espécie na medicina popular no tratamento de infecções de pele e aponta para novas indicações terapêuticas. No entanto, estudos posteriores devem ser conduzidos a fim de legitimar a espécie *L. thymoides* Mart. & Schauer como potencial produto farmacêutico.

REFERÊNCIAS

- GOMES, L. P. et al. *Bacillus cereus* em amostras de doces industrializados comercializados por comerciantes nos municípios de Seropédica e Itaguaí – RJ. **Rev. Univ. Rural**. Seropédica, v. 24, n. 2, p. 103-106, jul./dez. 2004.
- GÖRNEMANN, T. et al. Antispasmodic activity of essential oil from *Lippia dulcis* Trev. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.l.], v. 117, p. 166-169, 2008.
- LINDE, J. H. et al. Chemical composition and antifungal activity of the essentials oils of *Lippia rehmanii* from South Africa. **South African Journal of Botany**, [S.l.], v. 76, p. 37-42, 2010.
- PASCUAL, M. E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.l.], v. 76, p. 201-214, 2001.
- PESSOA, C. et al. Anticancer potential of Northeast Brazilian plants. **Lead Molecules from Natural Products**, [S.l.], v. 2, p. 197-211, 2006.
- PINTO, C. P. **Atividade antimicrobiana e perfil químico de espécies do gênero Lippia do Semi-árido da Bahia**. 2008. 117 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2008.
- RODRIGUES, V. D. **Atividade antimicrobiana de Lippia thymoides**. 2008. 62 f. Monografia (Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2008.
- SARRAZIN, S. L. F. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia grandis* Schauer (Verbenaceae) from the western Amazon. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 134, n. 3, p. 1474-1478, 2012.
- 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. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.l.], v. 20, n. 5, out./nov. 2010.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 5. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2008.