

ISSN: 2319-0124

ACÇÃO ANTIMICROBIANA DE ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DE DIFERENTES MARCAS PORTUGUESAS DE HORTELÃ PIMENTA

Alisson G. de PAULA¹; Luana C. da S. BARBIERI²; Tânia C.S.P. PIRES³; Maria J. ALVES⁴

RESUMO

Os óleos essenciais possuem uma complexa classe de substâncias provenientes do metabolismo secundário das plantas, podendo variar conforme as condições climáticas e nutritivas da planta, sendo assim o objetivo do trabalho foi avaliar através da concentração bactericida/fungicida e inibitória mínima, a acção antimicrobiana dos óleos essenciais de diferentes marcas de hortelã pimenta (*Mentha-peperita*) comercializado na cidade de Bragança em Portugal. As duas amostras testadas, apresentaram acção bioativa significativa, não apresentando acção fungicida e apresentando acção bactericida em apenas duas bactérias Gram positivas.

Palavras-chave: Antifúngico; Antimicrobiano; *Mentha-peperita*.

1. INTRODUÇÃO

Pertencentes à família Lamiaceae as espécies do género *Mentha*, conhecidas popularmente como hortelã-pimenta ou mentas, são muito utilizadas na medicina popular de vários países. Supõe-se que as hortelãs tenham sido introduzidas na Europa, via norte da África sendo hoje encontrado em toda a Europa, África e América (MALAQUIAS, 2014).

Em geral, há uma diversidade de acções tóxicas dos extratos sobre as bactérias, como ruptura da membrana citoplasmática, ruptura da força motora de protões, vazamento de electrões, coagulação do conteúdo de proteína celular e inibição da descarboxilação de aminoácidos. Os extratos também podem inibir a síntese de DNA, RNA, proteínas e polissacarídeos. O modo de acção dos extratos depende principalmente do tipo e das características dos componentes ativos (SALIHA, et al., 2018). O presente trabalho teve como objetivo testar o óleo essencial extraído de duas marcas de hortelã-pimenta, comercializadas em Bragança, Portugal. Os óleos foram testados em diferentes concentrações contra diferentes microrganismos, obtendo resultados de concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do Material e Extração

Foram utilizados cerca de 200 gramas de hortelã-pimenta de cada marca obtidas em diferentes ervanários, da cidade de Bragança em Portugal. Foram utilizadas as marcas *Raizes da Natureza* (RN)

¹Graduando em Ciências Biológicas IFSULDEMINAS – Campus Muzambinhos. E-mail: alissongpaula@gmail.com

²Graduada em Ciências Biológicas IFSULDEMINAS – Campus Muzambinhos. E-mail: luanabmuz@gmail.com

³Orientador, Instituto Politécnico de Bragança (IPB). E-mail: tania.pires@ipb.pt

⁴Orientador, Instituto Politécnico de Bragança (IPB). E-mail: maria.alves@ipb.pt

e *Morais e Costa & CA. LDA.*(MC). Sendo o óleo extraído por hidrodestilação (sistema clevenger).

2.2 Microrganismos Testados

Os óleos foram testados contra cinco bactérias Gram-negativas, sendo elas, *Enterobacter cloacae* (ATCC 49741), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Salmonella enterica* subsp (ATCC 13076), *Yersinia enterocolitica* (ATCC 8610) e três bactérias Gram-positivas, nomeadamente *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Todos estes microrganismos foram adquiridos na Frilabo, Porto, Portugal. As bactérias foram incubadas a 37 °C em meio apropriado, por 24 h antes da análise para manter a fase de crescimento exponencial. Também foram testados em dois fungos, sendo eles *Aspergillus fumigatus* (ATCC 204305) e *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404) adquiridos na Frilabo, Porto, Portugal.

2.3 ANÁLISES

2.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

As determinações de CIM em todas as bactérias foram realizadas usando ensaio colorimétrico de acordo com descrito por Pires et al, 2018. Foi preparado 50 mL de caldo Muller-Hinton (MHB) com Tween 80 (0,5%). O Inóculo foi preparado em caldo MHB (padronizado em $1,5 \times 10^6$ Unidade Formadora de Colônia (UFC) / mL). Foram adicionados 190 µL de meio MHB com Tween 80 e 10 µL de amostra no primeiro poço (microplaca de 96 poços em duplicado). Nos poços restantes foram adicionados com 90 µL de meio MHB com Tween 80. Em seguida, as amostras foram diluídas em série para obter as faixas de concentração (2,5% a 0,01%). Finalmente, 100µL de inóculo foi adicionado ao poço. Dois controlos negativos foram preparados: MHB com Tween 80 e outro com o extrato. Dois controlos positivos foram preparados com MHB com Tween 80 e cada inóculo e um com meio de cultura, antibióticos e bactérias. Ampicilina e Estreptomicina foram usadas para todas as bactérias testadas e Meticilina também foi usada para *Staphylococcus aureus*. As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 h. A CIM das amostras foi detectada após a adição (40 µl) de 0,2 mg/mL de cloreto de *p*-iodonitrotetrazolio (INT) e incubação a 37°C por 30 min.

A CIM foi definida como a menor concentração que inibe o crescimento bacteriano visível determinado pela mudança da coloração do extrato para rosa se os microrganismos forem viáveis. Para a determinação de CBM, 10 µL de líquido de cada poço que não apresentou alteração de cor foi plaqueado em ágar Sangue (7% sangue de ovelha) e incubado a 37°C por 24 h. A concentração mais baixa que não produziu crescimento determina a CBM. A CBM foi definida como a concentração mais baixa necessária para matar as bactérias.

2.3.2 Atividade Antifúngica

A atividade antifúngica foi realizada conforme descrito por Heleno et al., 2013. Os fungos foram mantidos em ágar malte e as culturas armazenadas a 4°C e posteriormente colocadas num novo meio e incubadas a 25°C por 72h. Para investigar a atividade antifúngica, os esporos fúngicos foram lavados da superfície de placas de ágar com solução salina 0,85% estéril contendo Tween 80 0,1% (v/v). A suspensão de esporos foi ajustada com solução salina estéril para uma concentração de aproximadamente $1,0 \times 10^5$ em um volume final de 100 µL por poço. Em seguida, 10 µL de cada amostra foi adicionado no primeiro poço (microplaca de 96 poços) em duplicado com 190 µL de Caldo de Extrato de Malte (MEB). Nos poços restantes foram colocados 90 µL de MEB médio. Em seguida, as amostras foram diluídas em série para obter as faixas de concentração (2,5% a 0,01%). As concentrações mais baixas sem crescimento visível (no microscópio binocular) foram definidas como CMI (Concentração Mínima Inibitória). A concentração fungicida (MFC) foi determinada por subcultivo em série de 2 µL de compostos testados dissolvidos em meio e inoculados por 72 h, em microplacas contendo 100 µL de MEB por poço e incubação adicional por 72 h a 25 °C. A concentração mais baixa sem crescimento visível foi definida como MFC indicando 99,5% de morte do inóculo original. O fungicida comercial Cetoconazol (Frilabo, Porto, Portugal) foi usado como controlo positivo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

De acordo com a tabela 1, podemos observar que nas concentrações testadas os óleos conseguiram inibir o crescimento de todas as estirpes bacterianas à exceção da *Pseudomonas aeruginosa* para ambas as amostras. Estes resultados são explicados pelos diferentes mecanismos de ação da *Pseudomonas aeruginosa*, entre os quais: capacidade de produzir uma cápsula extracelular de alginato, conter proteínas na matriz extracelular com capacidade de unir os antimicrobianos impedindo os péptidos antimicrobianos de alcançar os microrganismos, enzimas que modificam os antimicrobianos como β-lactamases e enzimas modificadoras de aminoglicósidos, permeabilidade limitada para os antimicrobianos além da possibilidade de gerar uma bomba dependente de energia que expulsa o antimicrobiano para fora da bactéria, conferindo maior resistência (Paz-Zarza et al., 2019). A concentração mínima inibitória apresentou melhores resultados para as bactérias Gram positivas em relação às bactérias Gram negativas com valores a variar entre 0,07% (*Listeria monocytogenes*) e 0,15% (*Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*). Segundo Araújo (2010) essa diferença deve-se às diferenças estruturais nas paredes celulares, pois as bactérias Gram-negativas apresentam parede mais complexa quimicamente, sendo constituída de proteínas, lipopolissacarídeos e fosfolipídeos proporcionando maior resistência, enquanto as bactérias Gram-positivas são cobertas, principalmente, por polissacarídeos neutros e ácidos. Além da capacidade bacteriostática, o óleo extraído a partir das duas marcas comerciais, também apresentou capacidade bactericida para *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* a uma concentração de 2.5%.

Tabela 1-Resultados da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM).

	Hortelã_Pimenta (RN)		Hortelã_Pimenta (MC)		Streptomycin 1mg/mL		Methicilin 1mg/mL		Ampicillin 10mg/mL	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Bactérias gram-negativas										
<i>Enterobacter Cloacae</i>	0,6	_c	0,3	_c	0,007	0,007	n,t	n,t	0,15	0,15
<i>Escherichia coli</i>	0,6	_c	0,6	_c	0,01	0,01	n,t	n,t	0,15	0,15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	_b	_c	_b	_c	0,06	0,06	n,t	n,t	0,63	0,63
<i>Salmonella enterocolitica</i>	0,3	_c	0,15	_c	0,007	0,007	n,t	n,t	0,15	0,15
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0,07	_c	0,07	_c	0,007	0,007	n,t	n,t	0,15	0,15
Bactérias Gram-positivas										
<i>Bacillus cereus</i>	0,15	_c	0,15	_c	0,007	0,007	n,t	n,t	n,t	n,t
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,15	2,5	0,07	2,5	0,007	0,007	n,t	n,t	0,15	0,15
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,15	2,5	0,15	2,5	0,007	0,007	0,007	0,007	0,15	0,15
Fungos										
	CMI	CFM	MIC	MFC		MIC		MFC		
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	0,3	_c	0,3	_c		0,06		0,125		
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,3	_c	0,15	_c		0,3		0,15		

_c Nenhuma inibição foi observada visualmente para a concentração máxima testada (2,5%).

_b O crescimento foi obtido para a concentração máxima testada (2,5%).

n.t Não testado.

Tendo em conta os resultados apresentados na tabela 1 os óleos testados apresentaram atividade fungistática sendo o óleo de Hortelã-Pimenta (MC), o que apresentou melhores resultados para *A. brasiliensis* (CIM= 0,3%) e *A. fumigatus* (CIM= 0,15%), embora não tivessem apresentado capacidade fungicida.

5.CONCLUSÃO

Perante os resultados obtidos, podemos afirmar que os óleos extraídos a partir de Hortelã-pimenta, apresentaram atividade antibacteriana com capacidade bacteriostática e fungistática para grande parte das bactérias e fungos, além da capacidade bactericida para duas das três bactérias Gram-positivas testadas.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, E. A. et al. Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. **Química Nova**, São Paulo, vol. 33, no 9, p. 1940-1948,2010.
- HELENO, Sandrina A. et al. Antimicrobial and demelanizing activity of Ganoderma lucidum extract, p-hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters. **Food and chemical toxicology**, v. 58, p. 95-100, 2013.
- MALAQUIAS, Geiz et al. Utilização na medicina popular, potencial terapêutico e toxicidade em nível celular das plantas *Rosmarinus officinalis L.*, *Salvia officinalis L.* e *Mentha piperita L.*(Família Lamiaceae). 2014.
- PAZ-ZARZA, V. M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez, S. G., & Vázquez-López, R. *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. **Revista chilena de infectología**, 36(2), 180-189., (2019). PIRES, Tânia CSP et al. Antioxidant and antimicrobial properties of dried Portuguese apple variety (Malus domestica Borkh. cv Bravo de Esmolfe).**Food chemistry**, v. 240, p. 701-706, 2018.
- SALIHA, Melle BELAIDI; AHLEM, Et Melle BELAOUEDJ. Effet des extraits de la Menthe Poivrée (Mentha Peperita) chez *Staphylococcus aureus* responsable des infections uro-génitales, 2018.