

SCREENING DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES DE PLANTAS AMAZÔNICAS

Karla Lagos NOGUEIRA¹; Ana Cristina da Silva PINTO²; Ana Lúcia Basílio CARNEIRO³; Wanderli Pedro TADEI⁴;

¹Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; ²Orientadora CPCS/INPA; ³Co-orientadora MORFOLOGIA/UFAM;

⁴Co-orientador CPCS/INPA.

1. Introdução

Um dos maiores problemas de saúde pública, enfrentados nas últimas décadas foi o agravamento da resistência a antimicrobianos em populações bacterianas, principalmente de origem hospitalar (Oliveira *et al.* 2009a e b). Atualmente, o problema da resistência tornou-se mais grave devido às dificuldades para a descoberta e o lançamento de novos antimicrobianos no mercado com o uso da metodologia tradicional de triagem, a partir de fungos e bactérias, o que vem tornando esses produtos cada vez mais escassos e mais caros. Uma das alternativas usadas pelas indústrias farmacêuticas tem sido a modificação química da estrutura dos antimicrobianos já existentes, na tentativa de torná-los mais eficientes ou de recuperar a atividade prejudicada pelos mecanismos bacterianos de resistência (Ostrosky *et al.* 2008).

Na busca de novos antimicrobianos devemos enfatizar aqueles de origem vegetal, uma vez que o Brasil apresenta a maior biodiversidade do planeta e que muitas plantas já vêm sendo vastamente usadas e testadas há anos com as mais diversas finalidades por populações do mundo inteiro. A maior parte da população brasileira (80%) consome apenas 37% dos medicamentos disponíveis, dependendo quase que exclusivamente de medicamentos de origem natural (Stieven *et al.* 2009; Bertucci 2009). Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas amazônicas frente a algumas linhagens de fungos e bactérias de interesse.

2. Material e Métodos

As espécies selecionadas no presente trabalho são espécies que já são utilizados como cosméticos e como fitoterápicos no mercado, são elas: *Curcuma longa* L., *Protium heptaphyllum* Aublet., *Cymbopogon winterianus* Jowitt, *Caryophyllus aromaticus* L., *Dipteryx odorata*, *Ocimum basilicum* L., *Aniba duckei* Kosterm., *Aniba canelilla* H.B.K., *Piper marginatum* Jacq. e *Piper peltatum* L.. As espécies foram coletadas na Reserva Adolpho Ducke, no comércio local e coletados em vários locais da cidade de Manaus. As espécies foram separadas em partes, secas em estufa a 35 °C e moídas em moinho de facas. Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação utilizando-se sistema de extração em Clevenger por 4 h e a espécie *Curcuma longa* por extração em Soxhlet com hexano por 3 h. Os óleos foram secos com o agente dessecante Na₂SO₄ anidro e armazenados em vidros âmbar em freezer (4°C) no banco de óleos da Fundação Paulo Feitoza e guardados na geladeira até o momento das avaliações de atividade biológica.

Para avaliar a atividade antimicrobiana foram utilizados microrganismos da American Type Culture Collection (ATCC), Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas (DPUA) e Coleção de Bactérias da Amazônia, Instituto Leônidas e Maria Deane, Fiocruz (CBAM). As cepas selecionadas para os testes foram: *E. coli* (CBAM 001), *S. aureus* (CBAM 324), *Streptococcus mutans* (CBAM 241), *Enterococcus faecalis* (CBAM 284), *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073), *Candida parapsilosis* (DPUA 113), *C. glabrata* (DPUA 1171), *C. tropicalis* (DPUA 114), *C. albicans* (DPUA 1340; ATCC 10231) e *Saccharomyces cerevisiae* (DPUA 365). Utilizou-se como meio de cultura ágar Sabouraud para *Candida* spp. e ágar Mueller Hinton para bactérias. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelos métodos de difusão em ágar (Carneiro *et al.* 2008) e microdiluição em caldo. De cada cultura, foi preparada uma suspensão para obter turvação equivalente a escala 1 de MacFarland. Os testes foram realizados em triplicata. No teste de difusão, utilizou-se 25 mL do meio de cultura em placas de Petri (90 x 15 mm). O inóculo (100 µL) foi semeado com auxílio de swab. Após perfuração de cinco orifícios de 6 mm de diâmetro no ágar, uma alíquota do óleo

(5 mg.mL⁻¹) e do controle negativo (DMSO) foi dispensada na cavidade. Os controles positivos foram antimicrobianos comerciais: ampicilina (10 µg), clorafenicol (30 µg), amoxicilina (20 µg) e itraconazol (10 µg). A leitura dos halos de inibição foi realizada após 18, 24 e 48 horas de incubação. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi avaliada pelo método de difusão em meio sólido e por microdiluição com o método colorimétrico utilizando-se rezarsurina®. Assim, para o teste em meio sólido, formulou-se 35 mL de meio de cultura com 200 µL da suspensão do microrganismo em placa de Petri (140 X 15 mm). Em cada placa foram preparados 30 orifícios de 4 mm de diâmetro. Nesses orifícios inoculou-se, em triplicata, 15 µL de uma série de 10 diluições das substâncias preparadas a partir de uma solução-estoque (5 mg.mL⁻¹). Após incubação nos intervalos de 18, 24 e 48 horas, mediram-se os halos de inibição em milímetros. A CIM foi determinada considerando-se a menor concentração que inibiu o crescimento do microrganismo.

Para o método de microdiluição foram utilizadas placas de 96 poços. Nas placas, de cada bateria de teste, foi distribuído 100 µL de meio de cultivo. Na linha A da placa, foi adicionado 100 µL da solução-estoque (50 mg.mL⁻¹). A partir desses orifícios, foram feitas diluições seriadas, transferindo-se 100 µL da linha A para a linha B, e assim sucessivamente. Foram então adicionados 100 µL das suspensões microbianas e o volume final em cada poço foi, portanto, de 200 µL. As placas foram seladas com parafilme e incubadas a temperatura controlada por um período de 24 e 48 horas. Após incubação foram adicionados 50 µL de rezarsurina® 0,01% e as microplacas reincubadas por período adicional de 4 horas. O indicador colorimétrico utilizado possui propriedade redox. A forma oxidada é azul (célula não viável) e a forma reduzida é rósea (célula viável). Após esse período foi observado a cor em cada poço, pois a cor rósea indica que não houve inibição do crescimento microbiano, confirmando a inexistência de princípio ativo e a cor azul foi indicativa de atividade antimicrobiana.

3. Resultados e discussão

Após a triagem preliminar pelo método de difusão em ágar, observou-se que dos sessenta e quatro testes realizados, vinte e um (32,8%) apresentaram resultados positivos, pois os halos de inibição foram significativos comparados com os padrões. Dentre os óleos testados o que exibiu melhores resultados foi *Cariophyllus aromaticus* L. (Tabela 1). Alguns óleos inibiram o crescimento de *E. coli*, *S. aureus*, *S. mutans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. albicans* e *S. cerevisiae*. Dentre as dez espécies que tiveram seus óleos essenciais avaliados, oito obtiveram halos de inibição frente a *E.coli* e cinco, os resultados mais significativos, frente a *C. parapsilosis* (Tabela 1). Observou-se que muitas amostras apresentaram halo de inibição de diferentes diâmetros. Entretanto, esses halos dependem do tamanho molecular e sua capacidade de difusão no meio de cultura, da atividade das substâncias, da origem do microrganismo, do pH dos substratos, da densidade do inóculo e do crescimento e atividade metabólica do microrganismo no meio (Bandeira *et al.* 2006; Carneiro *et al.* 2008).

Tabela 1. Média do diâmetro dos halos de inibição em mm dos óleos avaliados pelo método de difusão em ágar. Concentração de trabalho 50 mg/mL.

| Óleos essenciais | Ec | Sa | Sm | Ef | Ss | Cp | Cg | Ct | Ca | Sc |
|-----------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <i>C.longa</i> | 7 | - | n.t | n.t | n.t | n.t | - | - | - | - |
| <i>P.heptaphyllum</i> | 6 | - | n.t | n.t | - | n.t | - | n.t | - | - |
| <i>C. winterianus</i> | 8 | - | n.t | n.t | - | 15 | - | - | - | - |
| <i>C. aromaticus</i> | 7 | 12 | 8 | 8 | - | n.t | 15 | 15 | 8 | 12 |
| <i>D. odorata</i> | - | - | n.t | n.t | - | 8 | - | - | - | - |
| <i>O. basilicum</i> | 7 | - | n.t | n.t | - | n.t | - | - | n.t | - |
| <i>A. duckei</i> | - | - | n.t | n.t | - | 15 | - | - | - | - |
| <i>A. canelilla</i> | 6 | - | - | - | - | 10 | 10 | n.t | n.t | - |
| <i>P. marginatum</i> | 8 | n.t | - | - | - | 8 | n.t | - | n.t | - |
| <i>P. peltatum</i> | 10 | n.t | n.t | n.t | - | - | - | - | n.t | - |
| Ampicilina | 20 | 50 | 10 | 22 | 30 | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. | n.t |
| Amoxicilina | 21 | 60 | - | n.t | 25 | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. | n.t |
| Cloranfenicol | n.t | n.t | 33 | n.t | 28 | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. |
| Itraconazol | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. | 19 | 20 | 22 | 18 | n.t |

Ec: *E. coli*; Sa: *S. aureus*; Sm: *S. mutans*; Ef: *E. faecalis*; Ss: *S. salivarius*; Cp: *C. parapsilosis*; Cg: *C. glabrata*; Ct: *C. tropicalis*; Ca: *C. albicans*; Sc = *Saccharomyces cerevisiae*; - = resultado negativo; n.t. = não testado.

Os óleos de *A. canelilla* e *P. marginatum* apresentaram as menores CIMs (195,3 µg/mL). Os resultados indicam que *Cariophyllum aromaticus* L. (cravo-da-índia) foi ativa frente a maioria das cepas testadas (Tabela 2).

Segundo Holetz *et al.* (2002), extratos com CIM menor que 100 µg/mL são considerados ativos, extratos com CIM entre 100 e 500 µg/mL apresentam atividade moderada, entre 500 e 1000 µg/mL baixa atividade e maior que 1000 µg/mL é inativo. Considerando a faixa de corte preconizada, dez CIMs (42,9%) apresentaram atividade moderada (CIM entre 500 e 1000 µg/mL). Entretanto, é importante lembrar que nos bioensaios para determinar CIM em meio líquido, variáveis técnicas e biológicas dificultam a sua reprodutibilidade, tais como: tamanho do inóculo, fase de crescimento do microrganismo, características do meio e estabilidade do produto testado (óleo, extrato, fármaco) (Ribeiro *et al.* 2004).

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM, µg/mL) dos óleos frente a seis cepas pelo método de microdiluição.

| Óleos | Ec | Sa | Cp | Cg | Ct | Ca |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>C.longa</i> | >1000 | n.t | >1000 | n.t. | n.t. | n.t. |
| <i>P.heptaphyllum</i> | >1000 | n.t | n.t | n.t. | n.t. | n.t. |
| <i>C. winterianus</i> | n.t | n.t | 390,6 | n.t. | n.t. | n.t. |
| <i>C. aromaticus</i> | n.t | >1000 | 390,6 | 390,6 | 390,6 | 781,3 |
| <i>D. odorata</i> | >1000 | n.t | 390,6 | n.t. | n.t. | n.t. |
| <i>O. basilicum</i> | >1000 | n.t | n.t | n.t. | 781,3 | n.t. |
| <i>A. duckei</i> | >1000 | n.t | 390,6 | n.t. | n.t. | n.t. |
| <i>A. canelilla</i> | n.t | n.t | 195,3 | 390,6 | n.t. | >1000 |
| <i>P. marginatum</i> | >1000 | n.t | 195,3 | 390,6 | n.t. | >1000 |

Ec: *E. coli*; Sa: *S.aureus*; Cp: *C.parapsilosis*; Cg: *C.glabrata*; Ct: *C.tropicalis*; Ca: *C.albicans*; - = resultado negativo; n.t. = não testado.

4. Conclusão

Tendo em vista a utilização de óleos essenciais como alternativas antimicrobianas e antifúngicas frente a cepas de importante relevância na saúde pública devido à constante resistência adquirida por elas, pode-se perceber que o trabalho demonstrou que das dez

espécies cujos óleos foram testados em *screening* inicial por difusão em ágar, seis foram selecionadas para teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM) mostrando-se moderadamente ativos segundo Holetz *et al.* (2002). Desta forma, os óleos das espécies amazônicas *C. winterianus*, *C. aromaticus*, *D. odorata*, *A. duckei*, *A. canelilla* e *P. marginatum* podem estar disponíveis para posteriores teste químicos a fim de torná-los alternativas eficazes frente à problemática da resistência microbiana e até mesmo estudos para elucidar a qual ou quais constituintes químicos dos óleos de tais espécies se atribui essa atividade.

5. Referências

- Bertucci, A.; Olivaro, C.; da Silva, P.A.; Ramos, D.; Cerdeiras, M.P.; Vázquez, A. 2009. Initial antimicrobial activity studies of plants of the riverside forests of the southern Uruguay River. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(1A): 20-25.
- Bandeira, M.F.C.L., Teixeira, M.F.S., Abinader, C.D., Parente, R.C. and Lima, P.S.L. 2006. Avaliação in vitro da sensibilidade da *Candida albicans* ao hidróxido de cálcio associado ao óleo de copaíba. *Dentística on line*. 13: 12-22.
- Carneiro, A.L.B.; Teixeira, M.F.S.; Oliveira, V.M.A.; Fernandes, O.C.C.; Cauper, G.S.B.; Pohlit, A.M. 2008. Screening of Amazonian plants from the Adolpho Ducke forest reserve, Manaus, state of Amazonas, Brazil, for antimicrobial activity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 103(1): 31-38.
- Holetz, F.B.; Pessini, G.L.; Sanches, N.R.; Cortez, D.A.G.; Nakamura, C.V.; Dias-Filho, B.P. 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infections diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 97: 1027-1031.
- Marchese, J.A. 1999. Produção e detecção de artemisinina em plantas de *Artemisia annua* L. submetidas a estresse abiótico. *Dissertação de Mestrado, Biologia Vegetal*, Campinas, São Paulo, 88pp.
- Oliveira, A.C. Valentim, I.B.; Goulart, M.O.F.; Silva, C.A.; Bechara, E.J.H.; Trevisan, M.T.S. 2009. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, 32(3): 689-702.
- Oliveira, J.L.T.M.; Diniz, M.F.M.; Lima, E.O.; Souza, E.L.; Trajano, V.N.; Santos, B.H.C. 2009. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. Essential oils in Inhibiting the Growth of Bacterial Strains Isolated from the Patients with Conjunctivitis. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(1): 45-50.
- Ostrosky, E.A.; Mizumoto, M.K.; Lima, M.E.L.; Kaneko, T.M.; Nishikava, S.O.; Freitas, B.R. 2008. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2): 301-307.
- Ribeiro, M.O., Gomes, M.S., Senna, S.G., Rossetti, M.L.R. and Fonseca, L.S. 2004. Avaliação de testes rápidos em microplacas usando indicadores de viabilidade celular para determinação da susceptibilidade de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* à isoniazida e rifampicina, 30:455-460.
- Stieven, A.C.; Moreira, J.J.S.; Silva C.F. 2009. Óleos essenciais de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess): Avaliação das atividades microbiana e antioxidante. *Eclética Química*, 34(3): 7-13.