

Composição Química e Atividade Antibacteriana de Óleos Essenciais



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Amazônia Ocidental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 126

Composição Química e Atividade Antibacteriana de Óleos Essenciais

*Cláudia Majolo
Edsandra Campos Chagas
Francisco Célio Maia Chaves
Humberto Ribeiro Bizzo
Sílvia Imaculada Barros da Rocha
Susanne Regina Nazaré de Oliveira
Marjorie Aymê Souza de Oliveira*

Embrapa Amazônia Ocidental
Manaus, AM
2016

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Amazônia Ocidental

Rodovia AM 010, Km 29, Estrada Manaus/Itacoatiara

Caixa Postal 319

Fone: (92) 3303-7800

Fax: (92) 3303-7820

<https://www.embrapa.br/amazonia-ocidental>

www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Celso Paulo de Azevedo*

Secretária: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

Membros: *Maria Augusta Abtibol Brito de Sousa, Maria Perpétua Beleza Pereira e Ricardo Lopes*

Revisão de texto: *Maria Perpétua Beleza Pereira*

Normalização bibliográfica: *Maria Augusta Abtibol Brito de Sousa*

Editoração eletrônica: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

Foto da capa: *Francisco Célio Maia Chaves*

1ª edição

1ª impressão (2016): 300 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação
Embrapa Amazônia Ocidental**

Composição química e atividade antibacteriana de óleos essenciais / Claudia Majolo, Edsandra Campos Chagas, Francisco Célio Maia Chaves, Humberto Ribeiro Bizzo, Sílvia Imaculada Barros da Rocha, Susanne Regina Nazaré de Oliveira. – Manaus : Embrapa Amazônia Ocidental, 2016.

32 p. : il. color. - (Documentos / Embrapa Amazônia Ocidental, ISSN 1517-3135; 126).

1. Óleo essencial. 2. Atividade antibacteriana. 3. Planta bioativa. 4. Peixes. 5. Aquicultura. I. Majolo, Cláudia. II. Chagas, Edsandra Campos. III. Chaves, Francisco Célio Maia. IV. Bizzo, Humberto Ribeiro. V. Rocha, Sílvia Imaculada Barros. VI. Oliveira, Susanne Regina Nazaré de. VII. Série.

Autores

Cláudia Majolo

Química, doutora em Ciências Veterinárias,
analista da Embrapa Amazônia Ocidental,
Manaus, AM

Edsandra Campos Chagas

Engenheira de pesca, doutora em Aquicultura,
pesquisadora da Embrapa Amazônia Ocidental,
Manaus, AM

Francisco Célio Maia Chaves

Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia
(Horticultura), pesquisador da Embrapa Amazônia
Ocidental, Manaus, AM

Humberto Ribeiro Bizzo

Químico industrial, doutor em Química,
pesquisador da Embrapa Agroindústria de
Alimentos, Rio de Janeiro, RJ

Sílvia Imaculada Barros da Rocha

Bióloga, mestranda em Biologia de Água Doce e Pesca Interior, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM

Susanne Regina Nazaré de Oliveira

Bióloga, Uninorte Laureate International Universities, Manaus, AM

Marjorie Aymê Souza de Oliveira

Graduanda em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas (Ufam), Manaus, AM

Apresentação

A piscicultura intensiva vem crescendo a cada dia e por esse motivo têm sido mais frequentes os problemas e os prejuízos relacionados à sanidade.

As infecções por bactérias em peixes ou derivados são responsáveis por grandes perdas econômicas e podem causar danos à saúde humana, ao provocar doenças, por causa dos resíduos de antibióticos usados nas terapias dos cultivos. Conseqüentemente, os piscicultores vêm demandando, cada vez mais, pesquisas com a utilização de produtos alternativos para o controle das bacterioses. Tratamentos que possam substituir os produtos químicos e que não são nocivos à saúde humana e ao meio ambiente apresentam resultados promissores no controle de doenças bacterianas em peixes.

Assim, este documento apresenta protocolos para extração, análise da composição química e avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente à *Aeromonas hydrophila*.

Luiz Marcelo Brum Rossi
Chefe-Geral

Sumário

Composição Química e Atividade Antibacteriana de Óleos Essenciais.....	9
Introdução.....	9
Plantas bioativas.....	10
<i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E.Br. ex P. Wilson.....	11
<i>Lippia origanoides</i> Kunth.....	12
<i>Lippia sidoides</i> Cham.....	12
Protocolos para extração e avaliação da composição química de óleos essenciais.....	13
Processo de extração do óleo essencial.....	13
Processo de análise da composição química dos óleos essenciais.....	13

Protocolos para avaliação da atividade antibacteriana de óleos essenciais	15
Bioautografia Indireta (BI).....	15
Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	17
Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	19
Composição química e atividade antibacteriana de espécies de <i>Lippia</i>	20
Referências	25

Composição Química e Atividade Antibacteriana de Óleos Essenciais

Cláudia Majolo

Edsandra Campos Chagas

Francisco Célio Maia Chaves

Humberto Ribeiro Bizzo

Sílvia Imaculada Barros da Rocha

Susanne Regina Nazaré de Oliveira

Introdução

As bacterioses são responsáveis por perdas econômicas na aquicultura mundial (AUSTIN, B.; AUSTIN, D., 2007). Entre as bactérias que acometem os peixes de água doce destacam-se *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium columnare* e *Streptococcus agalactiae*, responsáveis por surtos frequentemente registrados nas pisciculturas brasileiras (FIGUEIREDO; LEAL, 2008; PILARSKI et al., 2008; BARONY et al., 2015; MARCUSO et al., 2015; SEBASTIÃO et al., 2015).

Em face dessa problemática, a avaliação de produtos alternativos, como os óleos essenciais de plantas bioativas, vem crescendo na aquicultura (HARIKRISHNAN et al., 2011; REVERTER et al., 2014; HASHIMOTO et al., 2016; MAJOLO et al., 2016), visando reduzir ou evitar a dependência de produtos químicos utilizados no tratamento dessas bacterioses e que geram impacto negativo nos peixes e no ambiente (CHAKRABORTY; HANCZ, 2011).

Na avaliação da atividade antibacteriana de plantas bioativas, são empregados métodos de triagem qualitativos e quantitativos. Os métodos de difusão e os bioautográficos são considerados qualitativos,

pois apenas indicam se há ou não atividade antibacteriana; já nos métodos quantitativos, como os de microdiluição, em que se realizam diluições seriadas do produto natural, é possível determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) (VALGAS, 2002).

Atividade antimicrobiana contra bactérias gram-negativas e gram-positivas é relatada para extratos e óleos essenciais das espécies *Mentha piperita* (hortelã-pimenta), *Ocimum gratissimum* (alfavaca-cravo), *Lippia alba* (erva-cidreira), *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta), *Zingiber officinale* (gengibre), entre outras plantas medicinais (BMIMICA-DUKIC et al., 2003; MATASYOH et al., 2007; SIVASOTHY et al., 2011; MAHBOUBI; KAZEMPOUR, 2014; SUTILI et al., 2014, 2015; BASHIR et al., 2015). Entretanto, há a necessidade de avaliar a atividade antimicrobiana dessas plantas contra isolados de *A. hydrophila*, um patógeno oportunista de grande ocorrência na criação de peixes.

Este documento apresenta protocolos para extração, análise da composição química e avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente à *A. hydrophila*. Os protocolos descritos foram validados para os seguintes óleos essenciais: *M. piperita*, *O. gratissimum*, *Z. officinale*, *L. alba*, *L. origanoides* e *L. sidoides*. Contudo, neste documento, somente serão apresentados os resultados para as espécies de *Lippia*.

Plantas bioativas

A família Verbenaceae tem ocorrência em todo o Brasil, ocupa substrato rupícola e terrícola, é nativa do Brasil, mas não endêmica. Compreende arbusto, árvore, erva, liana/volúvel/trepadeira e subarbusto (SALIMENA et al., 2015). Segundo Salimena e Mulgura (2015), a família Verbenaceae reúne cerca de 32 gêneros e 480 espécies, com distribuição neotropical. O Brasil reúne a maior riqueza da família, com

16 gêneros e 290 espécies, sendo 191 endêmicas. Os gêneros mais representativos na flora brasileira são de *Lippia* L., com 88 espécies, sendo 68 endêmicas, e *Stachytarpheta* Vahl, representado por 81 espécies, 75 endêmicas, ambos com maior riqueza nos cerrados e campos rupestres do Planalto Central e Cadeia do Espinhaço, localizada nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás. Os principais centros de diversidade específica das espécies de *Lippia* estão localizados no México e Brasil.

***Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex P. Wilson**

Conhecida popularmente como erva-cidreira, carmelitana (Figura 1), *L. alba* é uma espécie que apresenta como componentes majoritários do seu óleo essencial o geranial e neral, a carvona e o linalol (CUNHA et al., 2012; TAVARES et al., 2005). É um subarbusto aromático que ocorre praticamente em todas as regiões do Brasil. Tem grande importância na medicina popular do País, pois é usada principalmente como analgésico, anti-inflamatório, sedativo e antiespasmódico (LORENZI; MATOS, 2002). Seu óleo essencial possui atividade antibacteriana para *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus intermedius*, entre outros microrganismos (OLIVEIRA et al., 2006; NOGUEIRA et al., 2007). Em peixes, apresenta comprovada atividade anestésica, antiparasitária e antimicrobiana (CUNHA et al., 2010, 2011; TONI et al., 2014; SUTILI et al., 2015; SOARES et al., 2016).

Fotos: Francisco Célio Maia Chaves



Figura 1. Espécimes de *Lippia alba*.

***Lippia organoides* Kunth**

L. organoides é nativa da América Central e América do Sul (LORENZI; MATOS, 2002). No Brasil, esses arbustos, conhecidos popularmente como salva-de-marajó (Figura 2), têm ocorrência confirmada nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste. Essa espécie apresenta potencial antiparasitário e antimicrobiano, atribuído ao seu óleo essencial, rico em carvacrol, timol e γ -terpineno, com atividade contra *Lactobacillus casei*, *S. mutans*, *Salmonella enteritidis*, *E. coli* e *A. hydrophila* (OLIVEIRA et al., 2007; HENAO et al., 2010; BETANCOURT et al., 2012).

Fotos: Francisco Célio Maia Chaves



Figura 2. Espécimes de *Lippia organoides*.

***Lippia sidoides* Cham**

Espécie própria da vegetação do Semiárido Nordestino, ocorre como uma arvoreta ou subarbusto densamente ramificado de até 2 m de altura, com tronco até 8 cm de diâmetro (MATOS; OLIVEIRA, 1998). Conhecida como alecrim-pimenta (Figura 3), apresenta em seu óleo essencial cerca de 60% de timol ou uma mistura de timol e carvacrol (SOUZA et al., 2007; QUEIROZ et al., 2014). Entre os microrganismos sensíveis ao óleo essencial de *L. sidoides*, destacam-se *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus faecalis* (FABRI et al., 2011; VERAS et al., 2014). Em peixes, o óleo essencial de *L. sidoides* tem sido utilizado por apresentar atividades anestésicas e antimicrobianas (LORENZI; MATOS, 2002; SILVA et al., 2013; TONI et al., 2014).

Fotos: Francisco Célio Maia Chaves



Figura 3. Espécimes de *Lippia sidoides*.

Protocolos para extração e avaliação da composição química de óleos essenciais

Processo de extração do óleo essencial

O óleo essencial das espécies de *Lippia* foi extraído de folhas e inflorescências dessas plantas pelo processo de hidrodestilação, com o uso de aparelho tipo Clevenger. Em cada extração foram colocadas amostras de 500 g de folhas e inflorescências, se presentes, em balão de 12 L acoplado a uma manta aquecedora, adicionando-se água destilada até a imersão das folhas. Em seguida, a manta aquecedora foi ligada, e o processo, finalizado quando não mais observada nenhuma condensação do óleo. Ao final da extração, o óleo essencial foi separado em frascos de vidro, depois teve o peso registrado para avaliação do teor e, em seguida, armazenado sob refrigeração até o momento do uso (Figura 4).

Processo de análise da composição química dos óleos essenciais

Para avaliação da composição química dos óleos essenciais foi utilizado um cromatógrafo a gás Agilent (Palo Alto, EUA) 7890B equipado com coluna capilar HP-5 (5%-difenil-95%-dimetilsilicone, 30 m x 0,25

mm x 0,25 μ m) (Figura 5A). A programação de temperatura do forno foi de 60 °C a 240 °C, a 3 °C/minuto, usando-se hidrogênio como gás carreador (1,5 mL/minuto). Foi injetado 1,0 μ L de uma solução 1% do óleo essencial em diclorometano (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) no modo com divisão de fluxo (1:100; injetor a 250 °C). Os espectros de massa foram obtidos em um sistema Agilent 5975C operado no modo ionização eletrônica (EIMS) a 70 eV, acoplado a um cromatógrafo Agilent 7890A equipado com uma coluna HP-5 MS (5%-difenil-95%-dimetilsilicone, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) (Figura 5B), usando o mesmo procedimento de injeção e programa de temperatura como descrito acima. Hélio foi usado como gás carreador (1,0 mL/min). Os índices de retenção foram calculados a partir dos tempos de retenção dos componentes dos óleos e aqueles de uma série de n-alcacos (C₇-C₂₆). A identificação dos constituintes foi realizada por comparação dos espectros de massa obtidos com os dados de biblioteca espectral (Wiley 6th ed.) e pelos dos índices de retenção calculados e comparados com valores publicados (ADAMS, 2007).

Fotos: Francisco Célio Maia Chaves

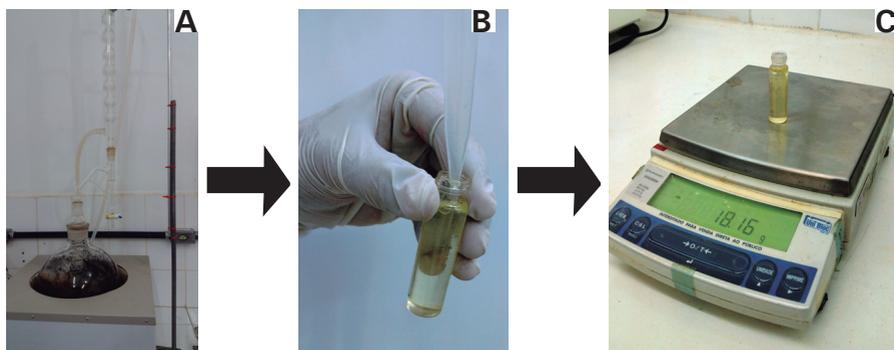


Figura 4. Processo de extração do óleo essencial: A) aparelho de Clevenger utilizado na extração; B) separação do óleo essencial; C) pesagem do óleo essencial obtido.

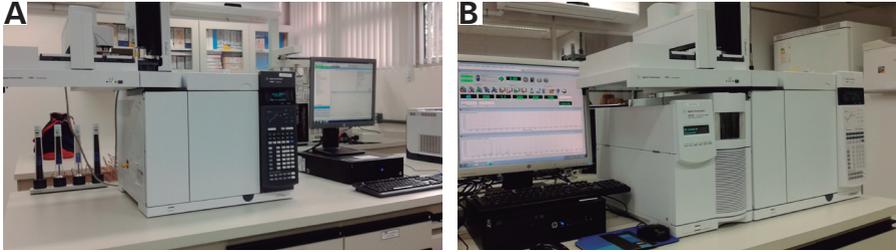


Figura 5. A) Cromatógrafo a gás (CG); B) sistema CG-EM.

Protocolos para avaliação da atividade antibacteriana de óleos essenciais

Bioautografia Indireta (BI)

A bioautografia é uma técnica utilizada para avaliar qualitativamente a atividade antibacteriana de substâncias sintéticas ou naturais. Nos ensaios de BI, os inóculos foram preparados a partir de placas com evidência de crescimento bacteriano, neste caso de *A. hydrophila*, sendo então diluídas em solução de NaCl 0,85%, ajustada para escala de McFarland 0,5 e confirmado por leitura em espectrofotômetro em 580 nm. As suspensões de células foram finalmente diluídas a 10^4 unidades formadoras de colônia (UFC) mL^{-1} .

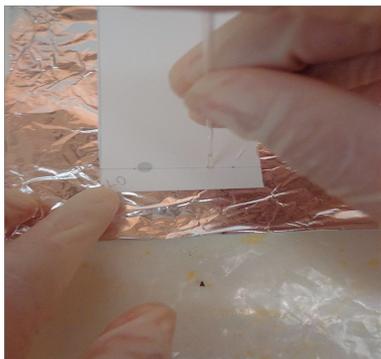
Os óleos essenciais de *L. alba*, *L. origanoides* e *L. sidoides* ($3 \mu\text{L}$ a 10 mg mL^{-1}), após a diluição em acetato de etila, foram aplicados em placas de sílica gel em duplicata. Uma mistura hexano:acetato de etila (85:15, v / v) foi usada como eluente. A revelação foi feita por exposição à luz ultravioleta e vapor de iodo, sendo esta última sem utilidade para o ensaio biológico. No ensaio, o cloranfenicol foi utilizado como controle positivo.

As suspensões de inóculos bacterianos preparadas como descrito acima foram então inoculadas por pour-plate em ágar Muller Hinton (1: 100). Uma alíquota de 0,5 mL de solução 1 mg mL^{-1} de cloreto de trifenil tetrazólio (TTC) foi adicionada como indicador de crescimento. O meio

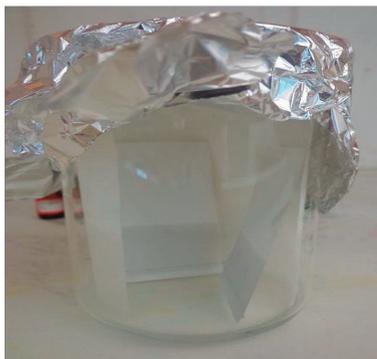
foi transferido para as placas de Petri, onde as placas de sílica foram previamente depositadas. Após homogeneização, as culturas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas.

A confirmação da atividade dos grupos de componentes separados foi comprovada por zonas de inibição reveladas após o período de incubação, sendo todas as etapas da BI ilustradas na Figura 6.

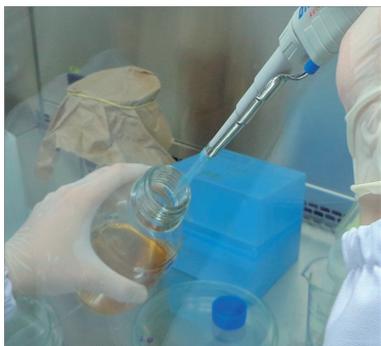
Fotos: Cláudia Majolo



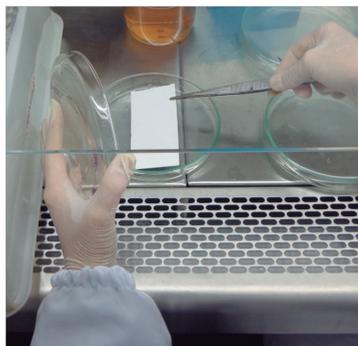
Aplicação da substância (óleo essencial, extrato, padrão) em placas de sílica gel.



Eluição das placas.



Inoculação do meio de cultura.



Sobreposição das placas.

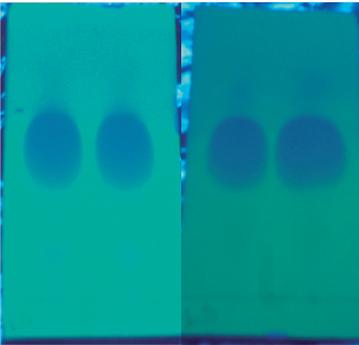
Fotos: Cláudia Majolo



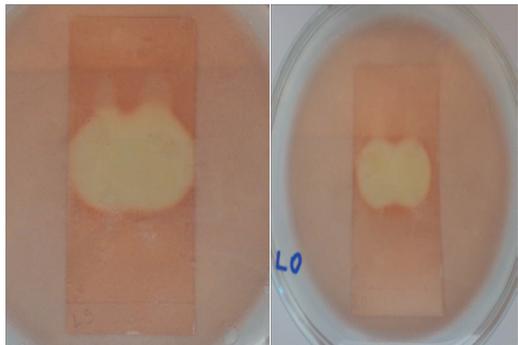
Meio de cultura sendo vertido na placa de Petri.



Revelação com vapor de iodo.



Revelação em UV.



Revelação da atividade antibacteriana com TTC.

Figura 6. Sequência das etapas da técnica qualitativa de bioautografia indireta.

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é definida como a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir o crescimento de um microrganismo. Essa determinação foi conduzida pelo método de microdiluição em caldo utilizando placas contendo 96 poços, conforme descrito pelo National Committee for Clinical and Laboratory Standards (M7-A6) (2003).

Para determinação, primeiramente a bactéria *A. hydrophila* (ATCC 7966) foi cultivada em Caldo de Infusão de Cérebro e Coração (BHI, do inglês “Brain Heart Infusion”) a 35 °C por 24 horas. Alíquotas de 200 μL do inóculo padronizado a partir do BHI incubado diluído em solução salina estéril (10^7 UFC mL^{-1}) foram transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de Caldo Mueller Hinton (MHB, do inglês “Mueller Hinton Broth”).

Em cada placa foram aplicados os óleos essenciais de *L. alba*, *L. origanoides* ou *L. sidoides* nas concentrações testadas, bem como o antimicrobiano cloranfenicol (Flucka BioChemika, St. Gallen, Switzerland) e o diluente dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), todos em triplicata. Também foram feitos controles negativos (meio sem adição de inóculo) e controles positivos (meio com adição de inóculo).

Antes de serem adicionados na microplaca, os óleos essenciais foram diluídos a partir de uma solução-estoque (0,2 g de óleo em 1 mL de DMSO, 200.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ solução-estoque). Para essa diluição, foi adicionado 1 mL da solução-estoque em 4 mL de MHB contendo 1% de DMSO, que resultou em uma solução com concentração de 40.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Dessa solução, foram retirados 100 μL e adicionados em três poços da primeira linha. Ao final, obtiveram-se 200 μL nos poços da linha A (100 μL de meio inoculado + 100 μL dos óleos diluídos). Em seguida, foram realizadas as microdiluições, obtendo-se as concentrações finais de 20.000, 10.000, 5.000, 2.500, 1.250 e 625 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cada óleo essencial avaliado. O padrão de antibiótico utilizado para verificação da atividade antimicrobiana foi o cloranfenicol usado na concentração de 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Em seguida, as placas foram fechadas e incubadas a 35 °C por 24 horas. Após o período de incubação, foi realizada a leitura das placas. O poço turvo representou crescimento bacteriano, e o poço límpido representou ausência de crescimento bacteriano. Na Figura 7, o poço assinalado em amarelo, onde não se observou crescimento (menor concentração), correspondeu ao valor de CIM.



Figura 7. Determinação da Concentração Inibitória Mínima por microdiluição em placas de 96 poços.

A confirmação do crescimento bacteriano nos poços foi realizada por meio da aplicação da solução aquosa estéril de TTC 0,5%, revelada pelo aparecimento de uma coloração avermelhada. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) representa a quantidade mínima de um antimicrobiano para inviabilizar a célula microbiana, ou seja, provocar danos irreversíveis à bactéria. Quando os valores da CBM são comparados com a CIM, pode-se avaliar se o composto é bacteriostático ou bactericida.

Para essa determinação foram realizadas sementeiras em placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar Mueller Hinton (MHA) a partir de todos os poços onde não houve revelação de crescimento bacteriano. Essas placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas.

Após o período de incubação foi feita a leitura das placas, sendo que a CBM foi correspondente à menor concentração onde não foi evidenciado crescimento bacteriano em placas (Figura 8). Os testes foram realizados em triplicata.



Figura 8. Determinação da Concentração Bactericida Mínima.

Composição química e atividade antibacteriana de espécies de *Lippia*

Os resultados da análise da composição química do óleo essencial de *L. alba*, *L. organoides* e *L. sidoides* são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Compostos majoritários dos óleos essenciais de *L. alba*, *L. organoides* e *L. sidoides*.

Componentes	Composição em %		
	<i>L. alba</i>	<i>L. organoides</i>	<i>L. sidoides</i>
α -tujeno	-	1,2	-
Mirceno	2,0	2,4	1,1
α -terpineno	-	1,1	-
p-cimeno	-	13,3	6,3
γ -terpineno	-	4,5	2,0
Linalol	1,5	2,8	-
4-terpineol	1,2	-	1,0
Umbelulona	-	1,1	-
Neral	16,6	-	-
Geranial	25,4	-	-

Tabela 1. Continuação.

Componentes	Composição em %		
	<i>L. alba</i>	<i>L. origanoides</i>	<i>L. sidoides</i>
Timol metil éter	-	-	1,0
Timol	-	9,9	76,6
Carvacrol	-	49,7	-
β -elemeno	2,0	-	-
β -cariofileno	6,6	6,6	5,0
β -selineno	1,3	-	-
δ -cadineno	1,2	-	-
Óxido de cariofileno	16,0	1,0	-
Epóxido de humuleno II	1,1	-	-

O rendimento de extração dos óleos essenciais avaliados foi de 0,30% para *L. alba*, 2,70% para *L. origanoides* e 4,36% para *L. sidoides*. Os componentes majoritários do óleo de *L. alba* foram o geranial (25,4%) e o neral (16,6%), sendo identificados 47 constituintes, o que representa cerca de 89,1% do óleo essencial. *L. origanoides* apresentou como constituintes majoritários o carvacrol (49,7%) e o *p*-cimeno (13,3%), sendo identificados 18 constituintes, representando 92,7% do óleo. O óleo de *L. sidoides* apresentou elevado percentual de timol (76,6%) e *p*-cimeno (6,3%), sendo identificados 21 constituintes, representando 98,6% do óleo essencial.

Destaca-se que a variação no teor e na composição dos óleos essenciais de diferentes espécies de plantas bioativas pode ser decorrente da parte da planta utilizada para extração, processo de extração, colheita, ambiente e solos diferenciados (LORENZI; MATOS, 2002; SOARES; TAVARES-DIAS, 2013). Além disso, uma característica do gênero *Lippia* é que o perfil químico do óleo essencial está sob controle genético, como já observado para as plantas selvagens e cultivadas de *L. integrifolia* (MARCIAL et al., 2016). A bioautografia revelada apresentou, para os óleos essenciais de *L.*

alba, *L. origanoides* e *L. sidoides*, apenas uma grande zona central de inibição de igual posição revelada pelo iodo e UV (Figura 9). Observou-se também que o solvente não exerceu nenhum efeito de inibição sobre o microrganismo (Figura 9).

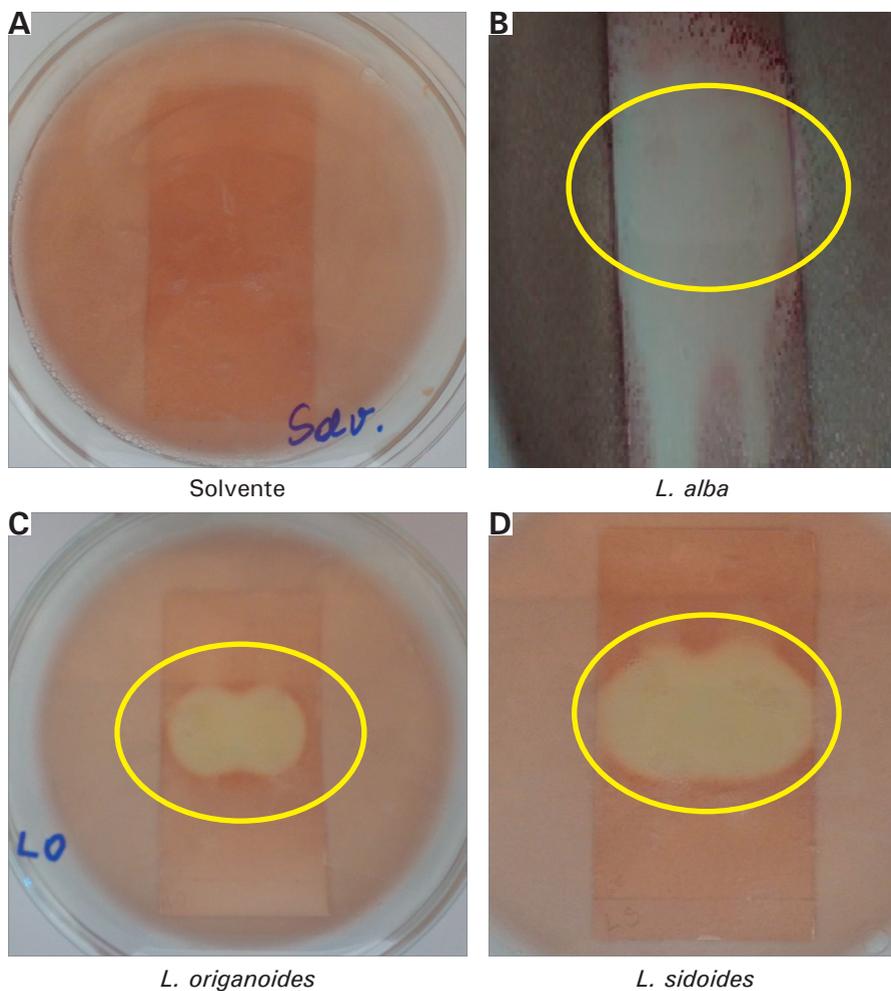


Figura 9. A) Revelação do crescimento bacteriano com TTC e zona de inibição (bioautografia) com emprego do solvente; B) óleo essencial de *Lippia alba*; C) *Lippia origanoides*; D) *Lippia sidoides*.

Pela técnica de microdiluição em caldo confirmou-se que os óleos essenciais de *L. alba*, *L. origanoides* e *L. sidoides* foram capazes de inibir o crescimento de *A. hydrophila*. Os valores de CIM e CBM variaram de 1.250 a 5.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 2).

Os óleos essenciais das espécies de *Lippia* apresentaram atividade bacteriostática (CIM) e bactericida (CBM) contra *A. hydrophila*. Contudo, o óleo essencial de *L. sidoides* apresentou melhor resposta na atividade antibacteriana quando comparado a *L. alba* (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *L. alba*, *L. origanoides* e *L. sidoides*.

Planta	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CBM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>Lippia alba</i>	5.000 ^a	5.000 ^a
<i>Lippia origanoides</i>	2.500 ^{ab}	2.500 ^{ab}
<i>Lippia sidoides</i>	1.250 ^b	1.250 ^b

As médias de cada coluna seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

CIM – Concentração Inibitória Mínima; CBM – Concentração Bactericida Mínima.

Em estudo realizado por Sutili et al. (2015), o óleo essencial de *L. alba* também demonstrou atividade bacteriostática e bactericida contra *A. hydrophila*, sendo que a CIM encontrada foi de 2.862 $\mu\text{g mL}^{-1}$ enquanto a CBM foi de 5.998 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Similarmente, atividade antibacteriana para diferentes espécies de *Lippia* (*L. origanoides*, *L. aff. gracillis* e *L. grandis*) contra bactérias gram-negativas e gram-positivas foi relatada, sendo mais pronunciada a atividade para gram-positivas, o que é explicado pela diferença na composição da membrana desses microrganismos (HENAO et al., 2010; PESSOA et al., 2005; SARRAZIN et al., 2012). Para *L. sidoides* foi observada atividade antibacteriana dessa planta contra *S. aureus* (SILVA et al., 2010), de forma similar aos resultados observados neste estudo com *A. hydrophila*, o que pode estar relacionado ao alto percentual de timol (76,6%) nesse óleo essencial.

Neste estudo, foi evidenciado que os compostos majoritários identificados nos óleos essenciais foram: geranial (25,4%), neral (16,6%) e óxido de cariofileno (16,0%) para *L. alba*; carvacrol (49,7%), *p*-cimeno (13,3%) e timol (9,9%) para *L. origanoides*; e timol (76,6%), *p*-cimeno (6,3%) e β -cariofileno (5,0%) para *L. sidoides*. Para esses óleos essenciais foi confirmada atividade antibacteriana contra *A. hydrophila*, indicando efeito inibitório mais pronunciado para o óleo essencial de *L. sidoides*. Estudos adicionais devem ser realizados com o isolamento dos compostos bioativos desse óleo visando avaliar o efeito individual ou sinérgico desses componentes antes da avaliação da eficácia in vivo em peixes cultivados, como método alternativo para o controle de patógenos na aquicultura.

Referências

ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography / mass spectrometry**. 4th ed. Boca Raton (IL): Allured Publishing Co., 2007. 804 p.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. **Bacterial fish pathogens**. Chichester, UK: Springer-Science, 2007. 552 p.

BARONY, G. M.; TAVARES, G. C.; ASSIS, G. B. N.; LUZ, R. K.; FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. New hosts and genetic diversity of *Flavobacterium columnare* isolated from Brazilian native species and Nile tilapia. **Inter Research**, v. 117, p. 1-11, 2015.

BASHIR, S. F.; GURUMAYUM, S.; KAUR, S. In vitro antimicrobial activity and preliminary phytochemical screening of methanol, chloroform, and hot water extracts of ginger (*Zingiber officinale*). **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 8, p. 176-180, 2015.

BETANCOURT, L.; PHANDANAUVONG, V.; PATINO, R.; ARIZA-NIETO, C.; AFANADOR-TELLEZ, G. Composition and bactericidal activity against beneficial and pathogenic bacteria of oregano essential oils from four chemotypes of *Origanum* and *Lippia* genus. **Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia**, v. 59, p. 21-31, 2012.

CHAKRABORTY, S. B.; HANCZ, C. Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. **Reviews in Aquaculture**, v. 3, p. 103-119, 2011.

CUNHA A. L. B.; CHAVES F. C. M.; BIZZO H. R.; SOUZA A. M. Caracterização química do óleo essencial de erva-cidreira, nas condições de Manaus, AM. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. S5780–S5784, 2012.

CUNHA, M. A.; BARROS, F. M. C.; GARCIA, L. O.; VEECK, A. P. L.; HEINZMANN, B. M.; LORO, V. L.; EMANUELLI, T.; BALDISSEROTTO, B. Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 306, p. 403-406, 2010.

CUNHA, M. A.; SILVA, B. F.; DELUNARDO, F. A. C.; BENOVI, S. C.; GOMES, L. C.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. Anesthetic induction and recovery of *Hippocampus reidi* exposed to the essential oil of *Lippia alba*. **Neotropical Ichthyology**, v. 9, p. 683-688, 2011.

FABRI, R. L.; NOGUEIRA, M. S.; MOREIRA, J. R.; BOUZADA, M. L. M.; SCIO, E. Identification of antioxidant and antimicrobial compounds of *Lippia* species by bioautography. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, p. 840-846, 2011.

FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 8-14, 2008.

HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M. S. Impact of plant products on innate and adaptative immune system of cultured finfish and shellfish. **Aquaculture**, v. 317, p. 1-15, 2011.

HASHIMOTO G. S. O.; MARINHO NETO F.; RUIZ M. L.; ACCHILE M.; CHAGAS E. C.; CHAVES F. C. M.; MARTINS M. L. Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean Parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. **Aquaculture**, v. 450, p. 182-186, 2016.

HENAO J.; MUÑOZ L. J.; PADILHA L.; RÍOZ, E. Extraction and characterization of the essential oil of H.B.K. "Orégano de *Lippia organoides* monte" cultivated at Quindío and evaluation of antimicrobial activity. **Research Journal University of Quindío**, v. 21, p. 82-86, 2010.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 544 p.

MAHBOUBI, M.; KAZEMPOUR, N. Chemical composition and antimicrobial activity of peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 36, p. 83-87, 2014.

MAJOLO, C.; ROCHA, S. I. B.; CHAGAS, E. C.; CHAVES, F. C. M.; BIZZO, H. R. Chemical composition of *Lippia* spp. essential oil and antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research**, p. 1-8, 2016.

MARCIAL, G.; LAMPASONA, M. P.; VEJA, M. I.; LIZARRAGA, E.; VITURRO, C. I.; SLANIS, A.; JUAREZ, M. A.; ELECHOSA, M. A.; CATALAN, C. A. N. Intraspecific variation in essential oil composition of the medicinal plant *Lippia integrifolia* (Verbenaceae). Evidence for five chemotypes. **Phytochemistry**, v. 122, p. 203-212, 2016.

MARCUSO, P. F.; ETO, S. F.; CLAUDIANO, G. S.; VIEIRA, F. C. F.; SALVADOR, R.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F.R. Isolamento de *Streptococcus agalactiae* em diferentes órgãos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques-rede. **Bioscience Journal**, v. 31, p. 549-554, 2015.

MATASYOH, L. G.; MATASYOH, J. C.; WACHIRA, F. N.; KINYUA, M. G.; MUIGAI, A. W. T.; MUKIAMA, T. K. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. growing in Eastern Kenya. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 760-765, 2007.

MATOS F.; OLIVEIRA F. *Lippia sidoides* Cham.: farmacognosia, química e farmacologia. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 79, p. 84-87, 1998.

MIMICA-DUKIC, N.; BOZIN, B.; SOKOVIC, M.; MIHAJLOVIC, B.; MATAVULJ, M. Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. **Planta Medica**, v. 69, p. 413-419, 2003.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically** — approved standard M7-A6. Wayne, PA, 2003. 87 p.

NOGUEIRA, M. A.; DIAZ, G.; SAKUMO, L. Chemical characterization and biological activity of essential oil from *Lippia alba*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, p. 273-278, 2007.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; BIZZO, H. R.; LOPES, D.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; LEITÃO, S. G. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K. **Food Chemistry**, v. 101, p. 236-240, 2007.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; SANTOS, S. S.; BIZZO, H. R.; LOPES, D.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S.; SUZANA, G. L. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, p. 103-108, 2006.

PESSOA, O. D. L.; CARVALHO, C. B. M.; SILVESTRE, J. O. V. L.; LIMA, M. C. L.; MOTTA NETO, R.; MATOS, F. J. A.; LEMOS, T. L. G. Antibacterial activity of the essential oil from *Lippia* aff. *gracillis*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 712-714, 2005.

PILARSKI, F.; ROSSINI, A. J.; CECCARELLI, P. S. Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* from four tropical fish species in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, p. 409-414, 2008.

QUEIROZ, M. R. A.; ALMEIDA, A. C.; ANDRADE, V. A.; LIMA, T. S.; MARTINS, E. R.; FIGUEIREDO, L. S. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia origanoides* frente à *Staphylococcus* sp. isolados de alimentos de origem animal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, p. 737-743, 2014.

REVERTER, M.; BONTEMPS, N.; LECCHINI, D.; BANAIGS, B.; SASAL, P. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: current status and future perspectives. **Aquaculture**, v. 433, p. 50-61, 2014.

SALIMENA, F. R. G.; MULGURA, M. E. Notas taxonômicas em Verbenaceae do Brasil. **Rodriguésia**, v. 66, p. 191-197, 2015.

SALIMENA, F. R. G.; THODE, V.; MULGURA, M.; O'LEARY, N.; FRANÇA, F.; SILVA, T. R. S.; SOUZA, V. C. Verbenaceae. In: LISTA de espécies da flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB246>>. Acesso em: 23 jun. 2016.

SARRAZIN, S. L. F.; OLIVEIRA, R. B.; BARATA, L. E. S.; MOURÃO, R. H. V. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia grandis* Schauer (Verbenaceae) from the western Amazon. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1474-1478, 2012.

SEBASTIÃO, F. A.; FURLAN, L. R.; HASHIMOTO, D. T.; PILARSKI, F. Identification of bacterial fish pathogens in Brazil by direct colony PCR and 16S rRNA gene sequencing. **Advances in Microbiology**, v. 5, p. 409-424, 2015.

SILVA, L. L.; SILVA, D. T.; GARLET, Q. I.; CUNHA, M. A.; MALLMANN, C. A.; BALDISSEROTTO, B.; LONGHI, S. J.; PEREIRA, A. M. S.; HEINZMANN, B. M. Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Neotropical Ichthyology**, v. 11, p. 443-451, 2013.

SILVA, V. A.; FREITAS, A. F. R.; PEREIRA, M. S. V.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P.; PEREIRA, A. V.; HIGINO, J. S. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides* Cham. sobre isolados biológicos de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, p. 452-455, 2010.

SIVASOTHY, Y.; CHONG, W. K.; HAMID, A.; ELDEEN, I. M.; SULAIMAN, S. F.; AWANG, K. Essential oils of *Zingiber officinale* var. *rubrum* Theilade and their antibacterial activities. **Food Chemistry**, v. 124, p. 514-517, 2011.

SOARES, B. V.; TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônica**, v. 3, p. 109-123, 2013.

SOARES, B. V.; NEVES, L. R.; OLIVEIRA, M. S. B.; CHAVES, F. C. M.; DIAS, M. K. R.; CHAGAS, E. C.; TAVARES-DIAS, M. Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia alba* on ectoparasites of *Collossoma macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological effects. **Aquaculture**, v. 452, p. 107-114, 2016.

SOUZA, M. F.; GOMES, P. A.; SOUZA JÚNIOR, I. T.; FONSECA, M. M.; SIQUEIRA, C. S.; FIGUEIREDO, L. S.; MARTINS, E. R. Influência do sombreamento na produção de fitomassa e óleo essencial em alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 108-110, 2007.

SUTILI F. J.; CUNHA M. A.; ZIECH R. E.; KREWER, C. C.; ZEPPENFELD, C. C.; HELDWEIN, C. G.; GRESSLER, L. T.; HEINZMANN, B. M.; VARGAS, A. C.; BALDISSEROTTO, B. *Lippia alba* essential oil promotes survival of silver catfish (*Rhamdia quelen*) infected with *Aeromonas* sp. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, p. 95-100, 2015.

SUTILI, F. J.; KREUTZ, L. C.; NORO, M.; GRESSLER, L. T.; HEINZMANN, B. M.; VARGAS, A. C.; BALDISSEROTTO, B. The use of eugenol against *Aeromonas hydrophila* and its effect on hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 157, p. 142-148, 2014.

TAVARES E. S.; JULIÃO L. S.; LOPES D.; BIZZO, H. R.; LAGE, C. L. S.; LEITÃO, S. G. Analysis of the essential oil from leaves of three *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) chemotypes cultivated on the same conditions. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 1-5, 2005.

TONI, C.; BECKER, A. G.; SIMÕES, L. N.; PINHEIRO, C. G.; SILVA, L.; HEINZMANN, B. M.; CARON, B. O.; BALDISSEROTTO, B. Fish anesthesia: effects of the essential oils of *Hesperozygis ringens* and *Lippia alba* on the biochemistry and physiology of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 701-714, 2014.

VALGAS, C. **Avaliação de métodos de triagem para determinação de atividade antibacteriana de produtos naturais**. 2002. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

VERAS, H. N. H.; RODRIGUES, F. F. G.; BOTELHO, M. A.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M. da. Antimicrobial effect of *Lippia sidoides* and thymol on *Enterococcus faecalis* biofilm of the bacterium isolated from root canals. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-5, 2014.

MCLAFFERTY, F. W.; STAUFFER, D.B. **Registry of mass spectral data**. 6th. ed. New York: Wiley Interscience, 1994.

Divulgação e acabamento
Embrapa Amazônia Ocidental



Amazônia Ocidental

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



CGPE 13118