

ANÁLISE QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *MENTHA PULEGIUM* L.

Leonardo Bindelli Verly, Ana Carla Rangel Rosa, Cecília Fernandes Patta Muller Marques, João Victor Andrade, Mario Ferreira Conceição Santos.

Universidade Federal do Espírito Santo/ Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Alto Universitário, S/N - Guararema, Alegre - 29500-000 – Alegre - ES, Brasil, leobindelli@gmail.com, anacarlarangelrosa@yahoo.com, ceciliafernandespmm@gmail.com, joaovictorandrade927@gmail.com, mariosantos408@gmail.com.

Resumo

Nos últimos anos, a busca por alternativas naturais no combate à microrganismos patogênicos vem ganhando grande relevância no meio farmacêutico. Os óleos essenciais (OE) são uma opção promissora para essa aplicação devido à ampla gama de compostos bioativos presentes em sua composição. Nesse sentido, foi avaliada a atividade antibacteriana do OE de *Mentha pulegium*, uma planta herbácea pertencente à família Lamiaceae, contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. O OE foi obtido por hidrodestilação das partes aéreas da planta em aparelho de Clavenger. A avaliação química do OE ocorreu por meio da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). O composto majoritário encontrado foi a pulegona (80,553%). Outros compostos foram encontrados em teores consideráveis, como a piperitenona (5,430%), ciclohexanona,5-metil-2-(1-metiletil)-,(2R-cis) (3,304%) e trans-Isopulegona (2,945%). A avaliação da atividade antimicrobiana revelou significativa eficiência contra *S. Aureus* (20 µg/ml) e *E. Colli* (2,5 µg/ml), demonstrando ser uma alternativa promissora frente aos antimicrobianos sintéticos.

Palavras-chave: GC-MS. Poejo. Etnobotânica. Farmacognosia.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas - Farmacologia

Introdução

O crescente aumento do número de casos de microrganismos resistentes aos antimicrobianos presentes no mercado farmacêutico atual acendem um alerta mundial para as instituições de saúde. Segundo o relatório do Sistema Global de Vigilância de Resistência e Uso de Antimicrobianos (GLASS), produzido em Genebra no ano de 2022 pela Organização Mundial de Saúde (OMS), as infecções bacterianas comuns estão se tornando cada vez mais resistentes aos tratamentos. Estima-se que mais de 42% das infecções globais causadas por *Escherichia Coli* e 35% das provocadas por *Staphylococcus aureus* apresentaram resistência ao antimicrobiano metilicina (World Health Organization, 2022).

Essa alarmante problemática incentiva a busca por alternativas naturais no combate aos microrganismos resistentes aos tratamentos convencionais, como os óleos essenciais. Segundo Nascimento *et al.* (2007), os óleos essenciais são uma opção promissora para o combate à microrganismos resistentes aos antibióticos devido à ampla gama de compostos terpenóides presentes em sua composição, que atuam sinergicamente e por diferentes vias para a inibição do desenvolvimento dos patógenos, além de outros compostos com atividades antimicrobianas já descritas.

A espécie vegetal *Mentha pulegium* trata-se de uma planta herbácea, pertencente à família Lamiaceae, característica por abrigar diversas espécies de plantas mentoladas. É utilizada na etnobotânica para o tratamento de diversas condições de saúde, como inflamações, resfriados, desconfortos gastrointestinais e distúrbios no ciclo menstrual. Diversos estudos apontam sua atividade farmacológica, apresentando caráter antiinflamatório, antiespasmódico, antioxidante e relaxante, além de apresentar atividade abortiva no miométrio de ratos. (Gruenwald *et al.*, 2000, Miraj; Kiani 2006, Amtagrh; Slaoui; Eddouks, 2024).

Dessa forma, o presente trabalho buscou avaliar a composição química e a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *M. pulegium* contra *S. aureus* e *E. coli* através de ensaios *in vitro*.

Metodologia

A coleta do material vegetal foi realizada em uma propriedade particular, circundante ao centro da cidade do município de Alegre, Espírito Santo, Brasil (20°45'S – 41°31'W).

Figura 1 – Coleta do material vegetal



Fonte: Os autores (2024).

Em seguida, o material foi levado ao Laboratório Química Orgânica de Farmacognosia (LQ4) da Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Alegre. As partes da planta foram devidamente higienizadas sob água corrente e secas com o auxílio de um papel toalha para a remoção do excesso de umidade. O passo seguinte foi a redução do tamanho das partes do vegetal, utilizando-se uma tesoura cortar o material em pequenos pedaços.

Para a extração do óleo essencial, utilizou-se a técnica de hidrodestilação em aparelho tipo Clavenger modificado. Utilizaram-se 910g de material vegetal (caules e folhas), que foram submetidos a hidrodestilação em 1.500ml de água destilada pelo período de 16h. O óleo obtido foi armazenado em frasco de vidro de cor âmbar sob refrigeração em 5°C.

Figura 2 – Processo de obtenção do OE



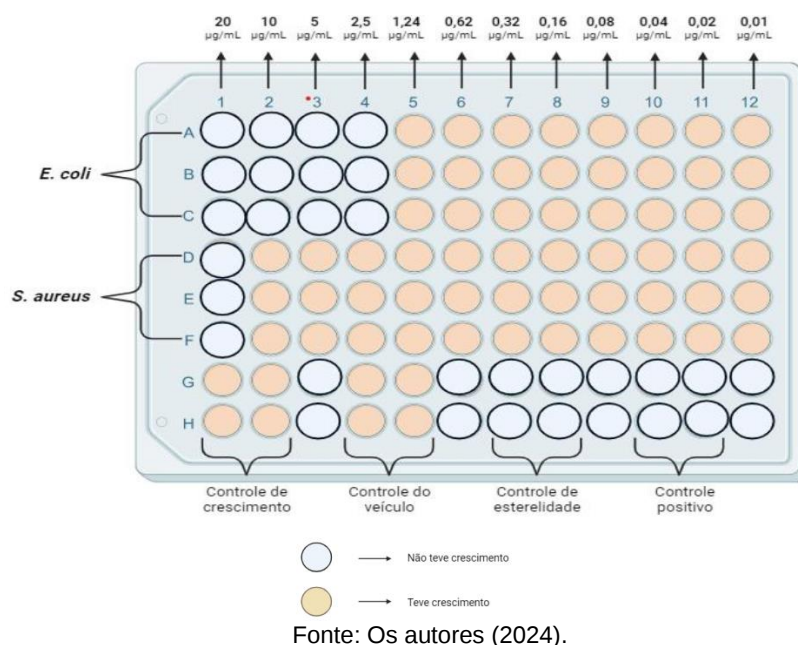
Fonte: Os autores (2024).

Para a análise da composição química, foi empregada a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) utilizando o equipamento Shimadzu QP2010-Plus. As condições cromatográficas incluíram uma coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária Rtx®-5MS, utilizando N₂ e He como gases de arraste. A temperatura do forno variou de 40 °C a 240 °C. A

identificação dos componentes químicos foi realizada comparando os espectros de massa com bancos de dados e índices de retenção (Wiley7, NIST05 e NIST05s). A porcentagem relativa de cada composto foi calculada para todos os constituintes da amostra, considerando compostos com área relativa superior a 1%.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana, as linhagens bacterianas utilizadas neste estudo foram *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pelo método de microdiluição em caldo modificado. Os ensaios foram conduzidos em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços, em triplicata, com um volume final de 200 μ L. O meio de cultura utilizado foi Caldo Mueller Hinton (CMH) e a concentração final do inóculo foi padronizada para 5×10^5 UFC/mL. As concentrações testadas do óleo essencial (OE) variaram entre 0,01% a 20% (v/v), com soluções de OE acrescidas de 2,5% de DMSO para facilitar a solubilização. As microplacas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 20-24h. A CIM foi definida como a menor concentração de OE capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano. Foram incluídos controles de esterilidade, crescimento, solvente (DMSO) e um controle positivo (DMSO + gentamicina). Após o teste de microdiluição, foi realizado o plaqueamento dos poços da CIM e de duas concentrações superiores em placas de Petri com ágar nutriente, incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24h. A representação esquemática do ensaio está ilustrada na Figura 3.

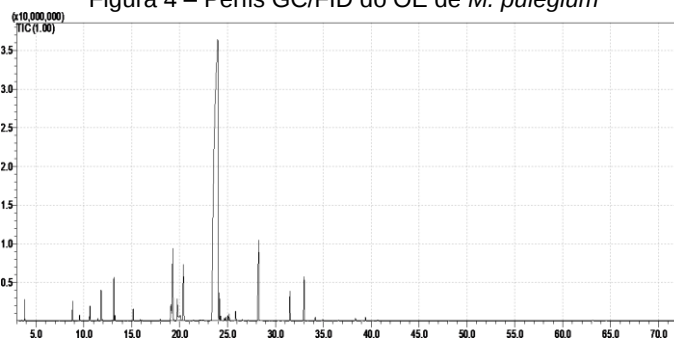
Figura 3 – Representação esquemática da microplaca após 24h de incubação



Resultados

A análise de GC-MS revelou 12 compostos, representando cerca de 99,31% da massa total de óleo. Os perfis GC/FID estão ilustrados na Figura 4. O perfil químico geral do óleo essencial, o tempo de retenção, índice de retenção e a área do óleo estão descritos na Tabela 1.

Figura 4 – Perfis GC/FID do OE de *M. pulegium*



Fonte: Os autores (2024).

Tabela 1 – Composição química do OE de *M. pulegium*

COMPOSTO	TR*	IR**	%***
1. Pulegona	1265	1233	80,553
2. Piperitenona	1363	1340	5,430
3. Ciclohexanona,5-metil-2-(1-metiletil)-,(2R-cis)	1172	0	3,304
4. trans-Isopulegona	1185	1179	2,945
5. α -Humulena	1478	1452	1,950
6. d-limoneno	1028	1024	1,501
7. β -cariofileno	1442	1417	1,269
8. 3-octanol	1000	0	1,036
9. α -Pineno	929	932	0,588
10. Cicloexanona	1186	0	0,582
11. β -Pineno	973	974	0,418
12. β -metilpropila	796	721	0,415

*Tempo de retenção (padrão)

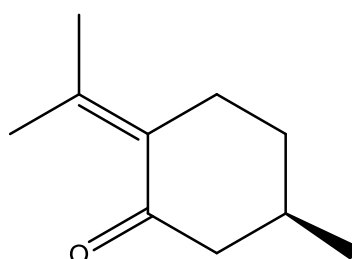
**Índice de retenção

***Área %

Fonte: Os autores (2024).

O esqueleto carbônico do composto majoritário (Pulegona) está descrito na figura a seguir (Figura 5).

Figura 5 – Estrutura química da Pulegona



Pulegona

Fonte: Os autores (2024).

Nos testes microbiológicos, os resultados obtidos na CIM foram de 20 $\mu\text{g/ml}$ para *S. aureus* e 2,5 $\mu\text{g/ml}$ para *E. coli*. A CBM foi semelhante à CIM, o que evidencia a atividade bactericida do OE. (Tabela 2).

Tabela 2 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do OE frente *S. aureus* e *E. coli*.

Microrganismo	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
<i>S. Aureus</i>	20	20
<i>E. coli</i>	2,5	2,5

Fonte: Os autores (2024).

Discussão

Em relação aos compostos identificados pela cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), existe uma série de fatores podem influenciar no metabolismo da planta e, consequentemente, alterar a composição de seu óleo essencial. Alguns desses fatores são o tipo de solo, a pluviosidade, a microbiota do solo e a incidência de luz solar (Badal; Delgoda, 2017).

Diversos estudos publicados sobre a composição química do óleo essencial de *M. pulegium* apresentaram a pulegona como componente majoritário, como Stoyanova *et al.* (2005), Lorenzo *et al.*, (2012), El-Ghorab (2006) e Mkaddem *et al.*, (2007), com 45,4%, 73,4%, 43,5% e 41,8%, respectivamente. Entretanto, o estudo de Mahboubi; Haghi (2008) apresentou a piperitona e a piperitonona como compostos majoritários (71,1%). Essas variações de composição química alteram as propriedades do óleo essencial, o que acarreta na perda ou potencialização de seus efeitos farmacológicos, tornando um grande desafio a padronização de sua composição química afim de assegurar a dosagem correta de seus compostos bioativos (Pandey *et al.*, 2020).

Os resultados dos testes microbiológicos indicaram que o óleo essencial de *Mentha pulegium* L. demonstrou maior atividade antibacteriana contra *E. coli* (2,5 µg/mL) em comparação com *S. aureus* (20 µg/mL). Embora Boukhebti *et al.* (2011) tenham relatado que bactérias Gram-positivas são geralmente mais suscetíveis aos óleos essenciais do que as Gram-negativas, este estudo revelou que *E. coli*, uma bactéria Gram-negativa, foi mais sensível ao óleo essencial de *M. pulegium* L., apresentando uma CIM menor do que *S. aureus*.

A presença de terpenóides na composição do óleo essencial de *M. pulegium* pode ser um fator determinante para sua atividade antimicrobiana. Conforme descrito por Griffin *et al.* (1999) em seu estudo que foi avaliada a relação entre a estrutura molecular de 60 terpenóides com sua atividade antimicrobiana, chegando a conclusão de que a atividade foi associada a parâmetros de ligação de hidrogênio e tamanho molecular, especialmente contra as bactérias Gram-negativas como a *E. coli*, correlacionando-se aos terpenos voláteis presentes em óleos essenciais, como a pulegona (um monoterpeno) encontrada no OE de *M. pulegium*.

Conclusão

As pesquisas voltadas por alternativas naturais no combate à microrganismos que adquiriram resistência aos antimicrobianos convencionais vêm sendo de grande interesse dos órgãos de saúde globais e da comunidade científica. *Mentha Pulegium* L. apresenta potencial promissor para o desenvolvimento de novos antimicrobianos, podendo ser utilizada na indústria alimentícia e farmacêutica. Entretanto, faz-se necessário mais estudos sobre a composição química, toxicidade e atividade farmacoterapêutica de seu óleo essencial para assegurar sua efetividade.

Referências

AMTAGHRI, S.; SLAOUI, M.; EDDOUKS, M. *Mentha pulegium*: A Plant with Several Medicinal Properties. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)**, v. 24, n. 3, p. 302-320, 2024.

BADAL, S.; DELGODA, R. **Pharmacognosy**. Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2017.

BOUKHEBTI, H. *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. **Der Pharmacia Lettre**, v. 3, n. 4, p. 267-275, 2011.

EL-GHORAB, A. H. The chemical composition of the *Mentha pulegium* L. essential oil from Egypt and its antioxidant activity. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 9, n. 2, p. 183-195, 2006.

GRIFFIN, S. G. *et al.* The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 14, n. 5, p. 322-332, 1999.

LORENZO, D. *et al.* Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 45, p. 519-524, 2002.

MAHBOUBI, M.; HAGHI, G. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 119, n. 2, p. 325-327, 2008.

MIRAJ, S.; KIANI, S. Study of pharmacological effect of *Mentha pulegium*: A review. **Der Pharmacia Lettre**, v. 8, n. 9, p. 242-5, 2016.

MKADDEM, M.; BOUSSAID, M.; FADHEL, N. B. Variability of volatiles in Tunisian *Mentha pulegium* L. (Lamiaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 19, n. 3, p. 211-214, 2007.

NASCIMENTO, P. F. C. *et al.* Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 108-113, 2007.

PANDEY, S. K. *et al.* Standardization of different drying methods of fresh Patchouli (*Pogostemon cablin*) leaves for high essential oil yield and quality. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 23, n. 3, p. 484-492, 2020.

STOYANOVA, A. *et al.* Chemical composition of the essential oil of *Mentha pulegium* L. from Bulgaria. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, n. 5, p. 475-476, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2022**. World Health Organization, 2022.

Agradecimentos

