

Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum applii* e *Origanum vulgare*

Rehder, V.L.G.; Machado, A.L.M.; Delarmelina, C.; Sartoratto, A.; Figueira, G.M.; Duarte, M.C.T.
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - CPQBA/UNICAMP, Campinas – SP, CP
6171 – 13083-970 (rehder@cpqba.unicamp.br).

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi estudar a composição química e a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *O. applii* e *O. vulgare* contra as bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Rhodococcus equi*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *S. epidermidis*, *Streptococcus faecium* e *Enterococcus faecium*. A avaliação da composição química dos óleos essenciais foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM). A atividade antimicrobiana foi averiguada inicialmente através de testes bioautográficos, com posterior determinação da concentração mínima inibitória (MIC) dos óleos essenciais. Os constituintes majoritários de *O. vulgare* e *O. applii* identificados por análise dos espectros de massas foram, respectivamente (%): p-cimeno, 4,27 e 9,37, a-terpinoleno, 9,13 e 30,23, linalol, 6,35 e 8,75; terpin-4-ol, 24,96 e 3,56 e carvacrol, 17,96 e 11,23. Os óleos essenciais das duas espécies de *Origanum* estudadas apresentaram forte atividade inibitória contra *Streptococcus faecium* e ação moderada contra *S. choleraesuis*, *S. aureus* e *B. subtilis*.

Palavras-chave: *Origanum applii*, *O. vulgare*, óleo essencial, atividade antimicrobiana, concentração mínima inibitória, plantas medicinais.

ABSTRACT: **Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from *Origanum applii* and *O. vulgare*.** The chemical composition and the antimicrobial activity of essential oil from *O. applii* and *O. vulgare* were studied against the bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Rhodococcus equi*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *S. epidermidis*, *Streptococcus faecium* e *Enterococcus faecium*. The essential oil was analyzed by Gas Chromatography Mass Spectroscopy (GC-MS). Antimicrobial activity was evaluated by bioautography with subsequent MIC (Minimal Inhibitory Concentration) determination. The main constituents of *O. vulgare* e *O. applii* essential oil was identified (%): p-cimeno, 4,27 and 9,37, a-terpinoleno, 9,13 and 30,23, linalol, 6,35 and 8,75; terpin-4-ol, 24,96 and 3,56 and carvacrol, 17,96 and 11,23, respectively. The essential oil of both *Origanum* species presented strong activity against *Streptococcus faecium* and moderate activity against *S. choleraesuis*, *S. aureus* and *B. subtilis*.

Key words: *Origanum applii*, *O. vulgare*, essential oil, antimicrobial activity, minimal inhibitory concentration, medicinal plants.

INTRODUÇÃO

As propriedades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais de diversas espécies vegetais têm sido reconhecidas empiricamente durante séculos, mas foram cientificamente confirmadas apenas recentemente (Gergis *et al.* 1990). Usos práticos dessas atividades foram sugeridos em humanos e animais, e nos últimos anos verificou-se também que alguns óleos essenciais são capazes de inibir bactérias deteriorantes de alimentos processados (Consentino *et al.* 1999).

Plantas superiores e aromáticas são amplamente utilizadas na medicina popular, bem como para aumentar o prazo de validade dos alimentos, uma vez que apresentam amplo espectro de atividade, com inibição observada contra bactérias, leveduras e fungos filamentosos (Hulin *et al.* 1998). A maioria dessas propriedades é devida a substâncias e óleos essenciais que as plantas contêm como produtos de seu metabolismo secundário, como pequenos terpenóides e compostos fenólicos, que também na forma pura exibem atividade antibacteriana e antifúngica (Adam *et al.* 1998).

Extratos e óleos essenciais de várias espécies mostraram-se eficientes no controle do crescimento de fungos relacionados a infecções

Recebido para publicação em 19/03/03
Aceito para publicação em 08/12/03.

superficiais da pele (Adam *et al.*, 1998), como também bactérias patogênicas bucais (Cecanho *et al.* 1999), e sobre uma ampla variedade de microrganismos, incluindo bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Galli *et al.* 1985).

Existe uma tendência para o aumento do uso destas plantas, o que se confirma pelos inúmeros estudos que abordam a atividade antimicrobiana da flora de uma determinada região. Dados da literatura mostram que vários grupos de pesquisadores têm realizado trabalhos abrangendo plantas medicinais utilizadas em Honduras (Lentz *et al.* 1998), Índia (Ahmad & Beg, 2001), Mediterrâneo (Panizzi *et al.* 1993), África (Baba-Moussa *et al.* 1999), Cuba (Martínez *et al.* 1996), Jordânia (Mahasneh *et al.* 1999), Palestina (Ali-Shtayeh *et al.* 1998), dentre outros, tendo sido confirmada a atividade das plantas nativas contra uma série de microrganismos.

Há que se considerar ainda que, na atualidade, as bactérias que causam prejuízos à saúde humana possuem resistência à maioria dos antimicrobianos. De acordo com Souza (1998) várias medidas tecnológicas são sugeridas para resolver o problema da resistência das bactérias, sendo uma delas a procura de novos antimicrobianos a partir de espécies vegetais.

No Brasil, estudos com a mesma finalidade são de grande importância, uma vez que plantas medicinais têm sido utilizadas em várias áreas da saúde como forma alternativa de tratamento e prevenção (Pereira *et al.* 1994). Além disso, nosso país apresenta uma rica biodiversidade, devendo-se considerar também o custo mais baixo destas formas terapêuticas em relação a medicamentos industrializados.

O *Origanum* tem origem européia, é amplamente cultivado no Brasil, e é utilizado como condimento. Apresenta grande variação na composição do óleo essencial e tem sido investigado quanto a sua atividade antimicrobiana. Os óleos essenciais de *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* e *Salvia fruticosa* exibiram propriedades antifúngicas contra os patógenos humanos *Malassezia furfur*, *Trichophyton rubrum* e *Trichosporum beigelii* (Adam *et al.*, 1998), sendo que o óleo de *O. vulgare* mostrou a mais alta atividade fungicida. À uma diluição de 1/50000, causou uma redução de 95% no número de células metabolicamente ativas, dentro de 6 horas de exposição. Dentre os principais componentes presentes nos óleos estudados, carvacrol e timol exibiram os mais altos níveis de atividade antifúngica. A eficácia terapêutica do óleo essencial de *O. vulgare* foi testada em ratos experimentalmente infectados com *T. rubrum*, e os resultados foram promissores.

Os óleos essenciais das plantas foram também testados para o teste AMES, e não exibiram qualquer atividade mutagênica.

O objetivo deste trabalho foi estudar a composição química e a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Origanum applii* (Domin) Borus e *O. vulgare* L.

MATERIAL E MÉTODO

Microrganismos

Os microrganismos utilizados no presente estudo foram obtidos junto a Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello": 1. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC13388, 2. *Salmonella choleraesuis* CCT4296, 3. *Rhodococcus equi* CCT0541, 4. *Micrococcus luteus* CCT2692, 5. *Staphylococcus aureus* CCT2740, 6. *Escherichia coli* CCT0547, 7. *Bacillus subtilis* CCT2576, 8. *S. epidermidis* ATCC12228, 9. *Streptococcus faecium* ATCC10541 e 10. *Enterococcus faecium* CCT5079. A manutenção das culturas foi feita por repicagem periódica no meio, seguido de incubação a 36°C até crescimento.

Meio de cultura

Foi utilizado o meio Nutriente Agar, contendo (g/L): extrato de carne, 3,0; peptona de carne, 5,0; agar-agar, 15,0; pH 7,0.

Plantas Medicinais

Folhas de Orégano (*O. applii* e *O. vulgare*) foram coletadas no dia 20 de novembro de 2001, no campo experimental do CPQBA/UNICAMP. As exsiccatas das espécies *Origanum applii* (Domin) Borus e *Origanum vulgare* L. Ssp *Virens* foram depositadas no herbário do Instituto de Biologia da UNICAMP, sob números UEC 121.410 e UEC 121.409, respectivamente.

Obtenção dos óleos essenciais das plantas

A extração dos óleos essenciais foi realizada por hidrodestilação em sistema do tipo Clevenger, pesando-se cerca de 40 g das partes aéreas da planta fresca em balão de fundo redondo de 1000 mL, adicionando-se 700 mL de água destilada e procedendo-se à destilação por 3 horas. Em seguida, a fase aquosa foi extraída com diclorometano (3 x 50 mL) e o solvente evaporado à secura sob vácuo a temperatura ambiente.

Padronização e preparo do inóculo (Eloff, 1998)

O inóculo dos diferentes microrganismos para os testes de atividade antimicrobiana foi preparado transferindo-se células do tubo de manutenção para frasco contendo água destilada esterilizada. A D.O. (densidade óptica) da suspensão foi acertada para absorvância correspondente à de 0,5 da escala de McFarland, em espectrofotômetro, de modo a padronizar a concentração inicial de células.

Testes de atividade antimicrobiana pelo método da bioautografia (Slusarenko *et al.*, 1998)

A suspensão de microrganismos preparada conforme descrito acima foi inoculada por técnica de "pour plate" nos meios de cultura especificados anteriormente, utilizando-se a proporção de 1:1000 (v/v). Uma alíquota de 0,5 mL de solução de cloreto de trifênil tetrazolium 1 mg/mL foi adicionada ao meio inoculado, como indicador da atividade respiratória das células. Em seguida, o meio foi vertido em placas de Petri, sobre as placas de CCD, onde foram anteriormente aplicados os óleos. Após homogeneização, o material foi incubado à 36°C durante 24 horas.

Determinação da MIC (Concentração Mínima Inibitória) dos óleos essenciais (Eloff, 1998)

A suspensão de microrganismos preparada conforme descrito acima foi inoculada por técnica de "pour plate" no meio de cultura, utilizando-se a proporção de 1:1000 (v/v). Uma alíquota de 0,5 mL de solução de cloreto de trifênil tetrazolium 1 mg/mL foi adicionada ao meio inoculado e a seguir o óleo essencial em diferentes concentrações (até 2,0 mg/mL). Após homogeneização, o meio foi vertido em placas de Petri e o material incubado a 36°C durante 24 horas. Cloranfenicol foi utilizado como controle positivo.

Leitura dos resultados

O revelador cloreto de trifênil tetrazolium permite observar se houve crescimento bacteriano, uma vez que as células com atividade respiratória coram-se de vermelho. No teste de bioautografia, permite avaliar qualitativamente se houve inibição do

crescimento em locais correspondentes a uma determinada fração do extrato vegetal corrida na placa em questão, através da formação de halos de inibição, região onde não haverá reação com o revelador. No caso dos testes de MIC, o meio de cultura ficará ou totalmente corado, indicando que não houve inibição do microrganismo, ou com a coloração inicial, indicando que não houve crescimento.

Análise cromatográfica dos óleos

A identificação dos constituintes dos óleos essenciais foi realizada através de análise em cromatógrafo à gás Hewlett-Packard 5890 Série II, acoplado com detetor seletivo de massas Hewlett-Packard 5971 (CG-EM), injetor *split/splitless*, utilizando-se uma coluna capilar HP-5 (30m x 0,25 mm x 0,25 mm). Temperaturas: injetor = 220°C, detetor = 280°C, coluna = 60°C, 3°C.min⁻¹, 240°C (7 min). Vazão do gás de arraste (He super seco) = 1,0 mL.min⁻¹.

RESULTADO E DISCUSSÃO

A avaliação da composição química dos óleos essenciais das duas espécies de *Origanum* foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM). Os constituintes foram identificados por comparação dos espectros de massas obtidos com os das bibliotecas espectrais Wiley-138 e Nist-98, bem como por comparação dos dados de Índice de Retenção e espectros de massa da literatura (Adams, 1995), coletados em condições cromatográficas similares e co-injeção de padrões autênticos, quando disponíveis.

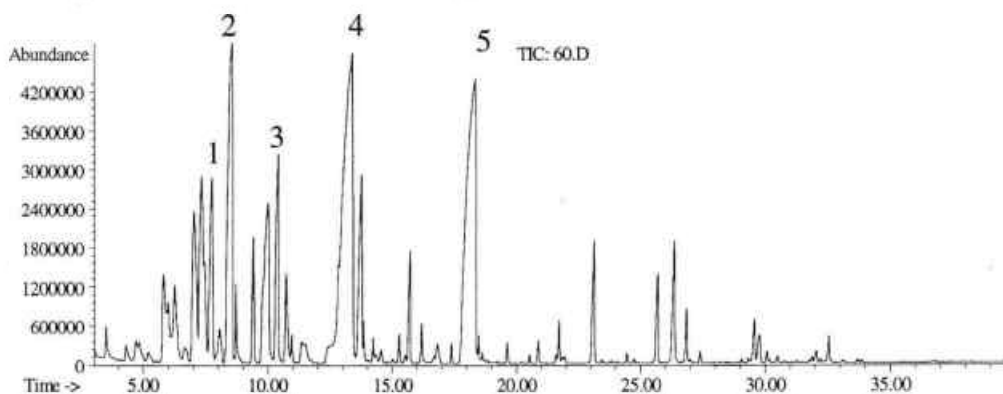
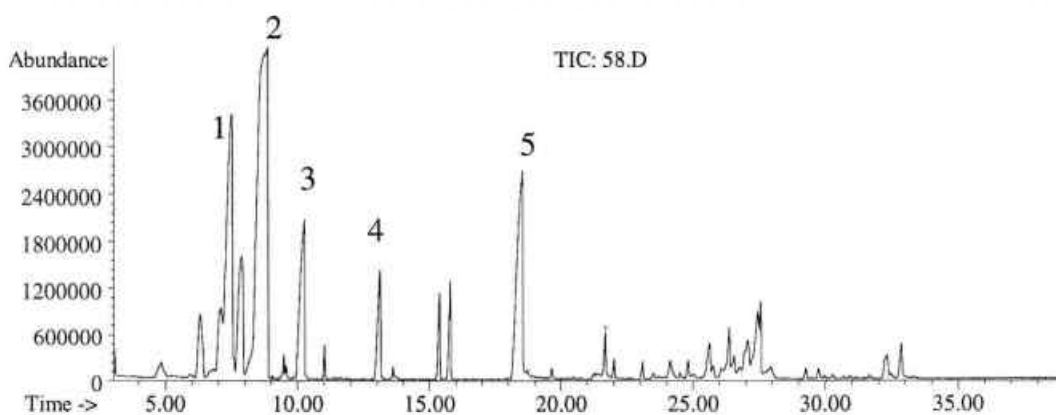
Os óleos essenciais de *O. vulgare* e *O. appli* são constituídos principalmente por monoterpenos, destacando-se o p-cimeno, a-terpinoleno, linalol, terpin-4-ol e carvacrol. Suas % relativas estão apresentadas na Tabela 1.

As principais diferenças observadas na composição química desses óleos estão relacionadas com os teores de γ -terpinoleno (2), cerca de três vezes mais abundante em *O. appli*, e terpin-4-ol (4), sete vezes mais abundante em *O. vulgare*.

Nas Figuras 1 e 2 estão apresentados os cromatogramas dos óleos essenciais de *O. vulgare* e *O. appli*.

TABELA 1 - Principais constituintes identificados nos óleos essenciais de *O. vulgare* e *O. appli* e suas porcentagens relativas.

Composto	<i>O. vulgare</i> (% relativa)	<i>O. appli</i> (% relativa)	t _R /min
p-cimeno (1)	4,27	9,37	7,51
γ -terpinoleno (2)	9,13	30,23	8,88
Linalol (3)	6,35	8,75	10,25
Terpin-4-ol (4)	24,96	3,56	13,12
Carvacrol (5)	17,96	11,23	18,53

FIGURA 1 - Cromatograma do óleo essencial de *O. vulgare***FIGURA 2** - Cromatograma do óleo essencial de *O. appli***TABELA 2** - Resultados dos testes de bioautografia (B) e de Concentração Mínima Inibitória (MIC) dos óleos essenciais de *O. vulgare* e *O. appli*.

Microrganismos	<i>O. vulgare</i>		<i>O. appli</i>		Cloranfenicol* MIC mg/mL
	B	MIC mg/mL	B	MIC mg/mL	
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	0,85
<i>S. choleraesuis</i>	++	0,60	++	0,60	0,06
<i>R. equi</i>	-	-	-	-	0,04
<i>M. luteus</i>	+	>2,0	+	>2,0	0,05
<i>S. aureus</i>	++	1,0	++	1,0	0,02
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	0,04
<i>B. subtilis</i>	++	1,0	++	1,2	0,02
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	0,04
<i>S. faecium</i>	++	0,4	++	0,2	0,12
<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	0,07

* Padrão de antibiótico utilizado como controle positivo (+) 1 fração ativa; (++) 2 frações ativas; (+++) três ou mais frações ativas e (-) nenhuma fração ativa.

Os óleos essenciais das duas espécies de *Origanum* estudadas apresentaram atividade contra as bactérias *S. choterasuis*, *M. luteus*, *S. aureus*, *B. subtilis* e *S. faecium* (Tabela 2). Os resultados dos testes de bioautografia foram indicados por sinais positivos, de acordo com o número de frações ativas observadas (halos de inibição – Tabela 2).

Testes de determinação da MIC dos óleos essenciais foram conduzidos apenas para os microrganismos cuja inibição fora detectada previamente no teste de bioautografia. Para avaliação dos resultados de MIC, foi utilizado como referência o trabalho de Aligiannis et al. (2001), que consideraram como de forte atividade antimicrobiana, óleos com MIC de até 0,5 mg/mL; de atividade moderada, os que apresentaram MIC entre 0,6 e 1,5 mg/mL; e de fraca atividade com MIC acima de 1,6 mg/mL. Os resultados de MIC para os microrganismos estudados estão apresentados na Tabela 2.

Os testes de bioautografia mostraram que os óleos das duas espécies de *Origanum* apresentaram respostas semelhantes frente aos microrganismos avaliados, mostrando forte ação inibitória contra *Streptococcus faecium*. Neste caso o MIC foi 0,4 mg/mL para *O. vulgare* e 0,2 mg/mL para *O. appli*, próximo ao do cloranfenicol (0,12 mg/mL). Os óleos apresentaram ação moderada contra *S. choterasuis*, *S. aureus* e *B. subtilis* (MIC entre 0,5 e 1,5 mg/mL).

CONCLUSÃO

Os óleos essenciais das duas espécies de *Origanum* estudadas apresentaram potencial como antimicrobiano, principalmente para *S. faecium* com MIC próximo ao do padrão de antibiótico utilizado.

AGRADECIMENTO

À FAPESP pelo suporte técnico.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ADAM, K.; SIVROPOULOU, A., KOKKINI, S. *et al.* Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* Essential Oils against Human Pathogenic Fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p.1739 - 45, 1998.
- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Carol Stream: Allured Publ. Corp., 1995. 469p.
- AHMAD, I., BEG, A.Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 74, n.2, p.113-23, 2001.
- ALIGIANNIS, N., KALPOUTZAKIS, E., MITAKU, S. *et al.* Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.49, p.4168-70, 2001.
- ALI-SHTAYEH, M.S. A., YAGHMOUR, R.M.R. A., FAIDI, Y.R.B. *et al.* Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. **Journal of Ethnopharmacology**, v.60, n.3, p.265-71, 1998.
- BABA-MOUSSA, F., AKPAGANA, K., BOUCHET, P. Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n.3, p.335- 8, 1999.
- CECANHO, R., KOO, H., ROSALEN, P.L.J.A. *et al.* Efeito do extrato hidroetanólico de *Mikania laevigata* sobre o crescimento bacteriano e a produção de glucosam por estreptococcus do grupo *mutans*. In: REUNIÃO DA FEDERAÇÃO DA SOCIEDADE DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 14, 1999, Caxambu. Anais... Caxambu, 1999, v.14, p.290, res.12095.
- CONSENTINO, S., TUBEROSO, C.I.G., PISANO, B. *et al.* *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of *Sardinian thymus* essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, v.29, p.130-5, 1999.
- ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v.64, n.8, p.711-3, 1998.
- GALLI, A., FRANZETTI, L., BRIGUGLIO, D. Attività antimicrobica *in vitro* di oli essenziali ed estratti di spezie di uso alimentare. **Industrie Alimentari**, p.463-6, 1985.
- HULIN, V., MATHOT, A.G.; MAFART, P. *et al.* Les propriétés anti-microbiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. **Sciences des Aliments**, v.18, p.563-82, 1998.
- GERGIS, V., SPILLOTIS, V., POULOS, C. Antimicrobial activity of essential oils from Greek *Sideritis* species. **Pharmazie**, v. 45, p.70, 1987.
- LENTZ, D. L., CLARK, A. M., HUFFORD, C. D. *et al.* Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. Short communication. **Journal. of Ethnopharmacology**, v. 63, p.253-63, 1998.
- MAHASNEH, A.M.A., ADEL, M.A., EL-OQLAH, A.A.B. Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan. **Journal of Ethnopharmacology**, v.64, n.3, p.271-6, 1999.
- MARTÍNEZ, M.J., BETANCOURT, J., ALONSO-GONZÁLEZ, N. *et al.* Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.52, n.3, p.171-4, 1996.
- PANIZZI, L., FLAMINI, G., CIONI, P. L. *et al.* Composition and antimicrobial properties of essential oils of 4 mediterranean Lamiaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v.30 n.3, p.167-70, 1993.
- PEREIRA, N. A., PEREIRA, B.M.R., DO NASCIMENTO, M.C. *et al.* Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as snake venom antifotes. IV. Protection against jararaca venom by isolated constituents. **Planta Medica**, v.60, p.99-100, 1994.
- SLUSARENKO, A.J., LONGLAND, A.C., WHITEHEAD, I.M. Convenient, sensitive and rapid assay for antibacterial activity of phytoalexins. **Dotanica Helvetica**, v.90, n.2, p.203-7, 1998.
- SOUZA, E.C. Bactérias ultraresistentes: uma guerra quase perdida. **Ciência Hoje**, v.138, n.23, p.26-35, 1998.