

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *OCIMUM SELLOI* BENTH. (LAMIACEAE)

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS FROM *OCIMUM SELLOI* BENTH. (LAMIACEAE)

Paulo Vitor Farago^{1*}, Josiane Padilha de Paula¹,
Jeanine Margraf Bittencourt², Vanessa Zarpellon³ e
Lizianne Elisa Mikosz Checchia³

^{1*} Autor para contato: Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, Campus em Uvaranas, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Ponta Grossa, PR, Brasil; (42) 2203120; e-mail: pvfarago@uepg.br

² Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, Campus em Uvaranas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Ponta Grossa, PR, Brasil; e-mail: jmbittencourt@uol.com.br

³ Universidade Estadual de Ponta Grossa, Campus em Uvaranas, Departamento de Ciências Farmacêuticas, PIBIC/CNPq/UEPG

Recebido para publicação em 10/02/2005

Aceito para publicação em 05/05/2005

RESUMO

Ocimum selloi Benth. (Lamiaceae), conhecida como alfavaca, é uma planta herbácea que ocorre no Brasil, empregada na medicina popular como anti-inflamatória e antiespasmódica. O objetivo do presente trabalho é avaliar a atividade antibacteriana de óleos essenciais pertencentes às variedades estragol e eugenol do táxon em estudo. A atividade antibacteriana das essências foi testada *in vitro*, por meio do teste de difusão em meio sólido, frente às cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922. As análises foram efetuadas em triplicata, utilizando como controle positivo, disco de cloranfenicol 50 µg e como controle negativo, disco estéril sem impregnação. Avaliaram-se, após 24 horas de incubação a 35±2°C, os halos com significância, quando maiores que 8 mm. Os óleos essenciais em questão apresentaram respostas semelhantes, com discreta ação antibacteriana para as cepas de *E. coli* e *S. aureus*.

Palavras-chave: óleo essencial, atividade antibacteriana, *Ocimum selloi*

ABSTRACT

Ocimum selloi Benth. (Lamiaceae), known as “alfavaca”, is a herbal plant native to Brazil. In the traditional medicine, *O. selloi* has been employed as an anti-inflammatory and an anti-spasmodic agent. The aim of this work is to evaluate the antibacterial activity of essential oils of the estragole and eugenol varieties of *O. selloi*. The essential oils were evaluated *in vitro* for their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 25922 strains by the agar disk diffusion method. The analyses were performed in triplicate. Chloramphenicol 50 µg was used as positive control and a sterile disc without impregnation was used as negative control. The halos were measured and considered significant when larger than 8 mm, after incubation for 24 h at 35±2°C. The antibacterial activity was similar for both essential oils, with a low response against *E. coli* and *S. aureus* strains.

Key words: essential oil, antibacterial activity, *Ocimum selloi*

1. Introdução

O uso de plantas como estratégia terapêutica é praticado por cerca de 85% da população dos países em desenvolvimento. Além disso, aproximadamente 120 medicamentos utilizados na medicina são provenientes diretamente de plantas, enquanto que muitos outros fármacos são obtidos por semi-síntese de produtos vegetais ou por síntese baseada em moléculas vegetais precursoras (Pezzuto, 1997).

O gênero *Ocimum* L. (Lamiaceae) compreende aproximadamente 50 espécies (Miele *et al.*, 2001) que se distribuem amplamente no mundo, sobretudo nas regiões tropicais e subtropicais (Vieira e Simon, 2000). Uma grande diversidade de espécies desse gênero é encontrada no Brasil. Os óleos essenciais de vários taxa do gênero *Ocimum* são empregados na indústria farmacêutica, alimentícia e de perfumaria (Martins *et al.*, 1997).

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de basilicão (*Ocimum basilicum* L.) contra microrganismos tem sido amplamente relatada (Prasad *et al.*, 1986; Deans e Ritchie, 1987; Dube *et al.*, 1989; Farag *et al.*, 1989; Meena e Sethi, 1994; Bais *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2005; Wannissorn *et al.*, 2005). Prasad *et al.* (1986) e Farag *et al.* (1989) ressaltam ainda que o óleo essencial obtido de *O. basilicum* e outras espécies de *Ocimum* são mais eficientes contra bac-

térias Gram-positivas (*Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Lactobacillus* sp.) que contra bactérias Gram-negativas (*Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp.).

O *Ocimum selloi* Benth. é uma espécie herbácea, perene (Vieira & Simon, 2000), de até 120 cm de altura, que floresce quase o ano todo. É conhecido popularmente como alfavaca (Morhy, 1973), anis do campo, erva-doce-silvestre, alfavaca-do-mato, hortelã-brava (Marquesini, 1995), alfavaca-de-anis, anis, alfavaquinha e elixir paregórico (Vieira & Simon, 2000). O seu cultivo é fácil e rápido, podendo a propagação ser obtida por estaquia.

Estudos etnobotânicos realizados com *O. selloi* revelaram que a planta é utilizada, por via oral, na medicina popular, em distúrbios digestivos e para o tratamento de inflamações, como gastrite e bronquite (Vieira & Simon, 2000). É empregada topicamente para aliviar dores nas pernas (Panizza, 1997).

Paula *et al.* (2003) desenvolveram um estudo a fim de avaliar a atividade repelente de insetos do óleo essencial de *O. selloi* da variedade estragol. Os autores encontraram uma redução média de 89% ($P < 0,01$) no número de picadas, em relação ao controle negativo.

Considerando o uso medicinal de *O. basilicum* como antimicrobiano, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a atividade antibacteriana de óleos essenciais pertencentes às variedades estragol e eugenol

do táxon *O. selloi*.

2. Material e métodos

As folhas de *Ocimum selloi* Benth. foram coletadas no município de Ponta Grossa – PR, em fevereiro de 2003, de exemplares cultivados. As exsiccatas foram preparadas de acordo com os critérios preconizados por Fidalgo & Bononi (1986), identificadas por taxonomista e depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa (HUEPG), sob o número HUEPG 10718. Após a coleta, as plantas foram submetidas a uma seleção visual, excluindo-se os materiais inorgânicos contaminantes. O material vegetal foi dessecado na temperatura ambiente e fragmentado com o auxílio de triturador mecânico.

A extração dos óleos essenciais de *O. selloi* foi realizada através de hidrodestilação, utilizando o aparelho de Clevenger para essências menos densas que a água (USP XXII, 1990). Manteve-se a destilação por 6 horas. Após este tempo, os óleos voláteis foram obtidos em tubo graduado. A confirmação dos constituintes químicos presentes nas amostras, especialmente os fenilpropanóides estragol e eugenol, foi efetuada por meio de cromatografia em camada delgada, utilizando como eluente o sistema de solventes tolueno/acetato de etila (93:7) (Wagner *et al.*, 1983), frente a padrões puros de terpenóides e fenilpropanóides, disponíveis no Laboratório de Farmacognosia da UEPG.

Procedeu-se os ensaios microbiológicos com os óleos essenciais pertencentes às variedades estragol e eugenol de *O. selloi* frente às cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922, empregando o método de difusão em meio sólido (Bauer *et al.*, 1966; NCCLS, 2000). Cada inóculo foi previamente preparado em soro fisiológico, padronizado pelo tubo 0,5 da Escala McFarland, em espectrofotômetro a 580 nm, correspondendo a aproximadamente 10^6 UFC/mL. Promoveu-se a semeadura dos inóculos bacterianos (0,01 mL) em placas contendo o meio Ágar Mueller-Hinton (MHA), com o auxílio de uma alça cali-

brada e de forma homogênea. Com uma micropipeta, realizou-se a impregnação de 0,02 µL (20 mL) dos óleos essenciais em estudo nos discos de papel de filtro previamente esterilizados. Utilizando-se uma pinça estéril, distribuíram-se os discos contendo os óleos essenciais pertencentes às variedades estragol e eugenol de *O. selloi*, de Cloranfenicol (50µg) como controle positivo e disco estéril sem impregnação como controle negativo.

Após 30 minutos, as placas foram incubadas invertidas em estufa a $35\pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. A seguir, realizou-se a medição do halo de inibição do crescimento bacteriano, com auxílio de uma régua graduada em mm, segundo a USP XXII (1990).

Para o controle de esterilidade, o meio MHA foi incubado em estufa a $35\pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas e 48 horas, antes do início do experimento. Todos os testes foram efetuados em triplicata, considerando-se a média das leituras como resultado final. Os halos com diâmetro igual ou superior a 8 mm foram considerados significativos (Lima *et al.*, 2000).

3. Resultados

Os resultados *in vitro* demonstram que os óleos essenciais de *O. selloi* estudados apresentaram uma discreta atividade antibacteriana para as cepas *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923 (Tabela 01). As duas variedades taxonômicas analisadas da essência de *O. selloi* não revelaram a formação de halos de inibição para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Para a essência de *O. selloi* da variedade estragol, foi observada a formação de um halo médio de inibição de 9,3 mm (variando de 9,0 a 10,0 mm) frente às cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e de *E. coli* ATCC 25922, quando da impregnação de 20 µL de óleo essencial por disco de papel de filtro previamente esterilizado. Para a variedade eugenol, nas mesmas condições de estudo, foram encontrados resultados análogos, com a verificação de um halo médio de inibição de 9,0 mm, frente às cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e de *E. coli* ATCC 25922.

Tabela 1 – Média dos resultados (em mm) nos ensaios de atividade antimicrobiana das variedades estragol e eugenol do óleo essencial de *O. selloi* (20 µL/disco), frente às cepas bacterianas testadas.

Microrganismos	Óleo essencial de <i>O. selloi</i> , variedade estragol	Óleo essencial de <i>O. selloi</i> , variedade eugenol	Controle positivo (cloranfenicol 50 µg)	Controle negativo (filtro sem impregnação)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	9,3	9,0	20	–
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	–	–	17	–
<i>E. coli</i> ATCC 25922	9,3	9,0	18	–

Legenda: – ensaio negativo.

4. Discussão

Wan *et al.* (1998), estudando a ação antibacteriana da variedade estragol do óleo essencial de *O. basilicum*, observaram a formação de uma zona de inibição ao redor dos discos com valor de 3 mm para *E. coli* NCTC 8196 e também de 3 mm para *S. aureus* NCTC 6571; para *P. aeruginosa*, os mesmos autores não verificaram a formação de zona de inibição. Como o principal componente de um dos óleos essenciais de *O. selloi* em análise também é o estragol, os resultados encontrados na presente pesquisa vão ao encontro dos citados por Wan *et al.* (1998).

Os halos médios de inibição obtidos para a variedade eugenol da essência de *O. selloi* são condizentes com as observações presentes na literatura para a espécie *O. gratissimum*. Nakamura *et al.* (1999) investigaram a atividade antimicrobiana da essência de *Ocimum gratissimum* L. Esses pesquisadores verificaram que a atividade do óleo essencial de *O. gratissimum* contra *S. aureus* (com concentração inibitória mínima de 0,75 µg/mL) foi maior que a encontrada para as outras bactérias testadas (*Shigella flexneri*, *Salmonella enteritidis*, *E. coli*, *Klebsiella* sp. e *Proteus mirabilis*), que variaram de 3 a 12 µg/mL. *P. aeruginosa* não foi inibida pelo óleo essencial, em concentrações de até 24 µg/mL. Por bioautografia, associada à técnica de cromatografia gasosa acoplada ao detector de massas, os autores observaram que o principal composto responsável pela atividade anti-

microbiana do óleo essencial de *O. gratissimum* contra *S. aureus* foi o fenilpropanóide eugenol.

Phadke e Kulkarni (1989) relatam que o extrato das folhas de *Ocimum sanctum* L. apresenta atividade antimicrobiana contra cepas de *S. aureus*, *Staphylococcus citreus* e *E. coli* em valores acima de 100, 250 e 500 µg/disco, respectivamente. Em função desses achados, não se descarta a possibilidade do óleo essencial de *O. selloi* ser efetivo contra microrganismos em concentrações acima da empregada no presente trabalho (20 µL/disco).

De forma complementar, pretende-se dar continuidade ao estudo, com a investigação da atividade antifúngica da espécie *O. selloi*, uma vez que as pesquisas realizadas por Lima *et al.* (1993) demonstram a atividade antifúngica da espécie *O. gratissimum* contra cepas dos dermatófitos *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* e *Epidermophyton floccosum*.

5. Conclusões

As variedades taxonômicas estragol e eugenol do óleo essencial das folhas de *Ocimum selloi* Benth. apresentam uma discreta atividade antibacteriana *in vitro* contra as cepas de *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923. Porém, não revelam a formação de halos de inibição para a bactéria *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Agradecimento

Os autores agradecem à taxonomista Dr^a. Inês Janete Mattozo Takeda pela identificação da espécie.

REFERÊNCIAS

1. BAIS, H.P.; WALKER, T.S.; SCHWEIZER, H.P. & VIVANCO, J.M. Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. **Plant Physiol. Biochem.**, v.40, p.983-995, 2002.
2. BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C. & TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.45, n.4, p.493-496, 1966.
3. DEANS, S.G. & RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **Intern. J. Food Microbiol.**, v.5, n.2, p.165-180, 1987.
4. DUBE, S.; UPADHYAY, P.D. & TRIPATHI, S.C. Antifungal, physicochemical and insect-repelling activity of the essential oil of *Ocimum basilicum*. **Can. J. Bot.**, v.67, p.2085-2087, 1989.
5. FARAG, R.S.; DAW, Z.Y.; HEWED, F.M. & EL-BAROTY, G.S.A. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oil. **J. Food Protect.**, v.52, n.9, p.665-667, 1989.
6. FIDALGO, O. & BONONI, V.L.R. **Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico**. São Paulo: Instituto de Botânica, 1986. 156 p.
7. LIMA, E.O.; GOMPERTZ, O.F.; GIESBRECHT, A.M. & PAULO, M.Q. *In vitro* antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. **Mycoses**, v.36, n.9-10, p.333-336, 1993.
8. LIMA, E.O.; GUERRA, M.F.L. & SILVA, M.G. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae). **Rev. Bras. Farm.**, v.81, n.3-4, p.95-97, 2000.
9. MARQUESINI, N.R. **Plantas usadas como medicinais pelos índios do Paraná e Santa Catarina, sul do Brasil – Guarani, Kaingang, Xogleg, Ava-Guarani, Kraô e Cayuá**. Curitiba, 1995. 290 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Botânica), Universidade Federal do Paraná.
10. MARTINS, E.R.; CASALI, V.W.D.; BARBOSA, L.C.A. & CARAZZA, F. Essential oil in the taxonomy of *Ocimum selloi* Benth. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.8, n.1, p.29-32, 1997.
11. MEENA, M.R. & SETHI, V. Antimicrobial activity of essential oils from spices. **J. Food Sci. Technol.**, v.31, n.1, p.68-70, 1994.
12. MIELE, M.; DONDERO, R.; CIARALLO, G. & MAZZEI, M. Methyleugenol in *Ocimum basilicum* L. Cv. Genovese Gigante. **J. Agric. Food Chem.**, v.49, p.517-521, 2001.
13. MOREIRA, M.R.; PONCE, A.G.; DEL VALLE, C.E. & ROURA, S.I. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT**, v.38, p.565-570, 2005.
14. MORHY, L. Metil-chavicol, *cis* e *trans* anetol no óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v.45, n.3-4, p.401-412, 1973.
15. NAKAMURA, C.V.; UEDA-NAKAMURA, T.; BANDO, E.; MELO, A.F.N.; CORTEZ, D.A.G. & DIAS FILHO, B.P. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.94, n.5, p.675-678, 1999.
16. NCCLS (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARD). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**: twelfth informational supplement. Wayne: The National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000.
17. PANIZZA, S. **Plantas que curam**: cheiro de mato. São Paulo: Editora IBRASA, 1997. 280 p.
18. PAULA, J.P.; GOMES-CARNEIRO, M.R. & PAUMGARTTEN, F.J.R. Chemical composition, toxicity and mosquito repellency of *Ocimum selloi* oil. **J. Ethnopharm.**, v.88, n.2-3, p.253-260, 2003.
19. PEZZUTO, J.M. Plant derived anticancer agents. **Biochem. Pharmacol.**, v.53, n.2, p.121-133, 1997.
20. PHADKE, S.A. & KULKARNI, S.D. Screening of *in vitro* antibacterial activity of *Terminalia chebula*, *Eclipta alba* and *Ocimum sanctum*. **Ind. J. Med. Scienc.**, v.43, n.5, p.113-117, 1989.
21. PRASAD, G.; KUMAR, A.; SINGH, A.K.; BHATTACHARYA, A.K.; SINGH, K. & SHARMA, V.D. Antimicrobial activity of essential oils of some *Ocimum* species and clove oil. **Fitoterapia**, v.57, n.6, p.429-432, 1986.
22. USP (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA). 22 ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 1990.
23. VIEIRA, R.F. & SIMON, J.E. Chemical characterization of basil (*Ocimum* spp.) found in the markets and used in traditional medicine in Brazil. **Econom. Bot.**, v.54, n.2, p.207-216, 2000.
24. WAGNER, H.; BLADT, S. & ZGAINSKI, E.M. **Drogenanalyse**: dunnschichtchromatographische analyse von arzneidrogen. Berlin: Springer-Verlag, 1983. 293 p.
25. WAN, J.; WILCOCK, A. & COVENTRY, M.J. Effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. **J. Appl. Microbiol.**, v.84, n.2, p.152-158, 1998.
26. WANNISSORN, B.; JARIKASEM, S.; SIRIWANGCHAI, T. & THUBTHIMTHED, S. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. **Fitoterapia**, v.76, p.233-236, 2005.