

Almira M. Lobato (*)

Antonia Ribeiro (**)

Maria de Fátima da S. Pinheiro (***)

José Guilherme S. Maia (***)

RESUMO

O presente trabalho propõe a identificação de atividade antimicrobiana em óleos essenciais de plantas odoríferas da região amazônica. As plantas que foram selecionadas, quatoze ao todo, são usadas em banhos aromáticos e como desinfetantes de roupas e armários. Entre nove bactérias patogênicas utilizadas para os ensaios, os óleos de *Piper hispidinervium*, *Abina rosaeodora* e *Alpinia speciosa* apresentaram atividade antibacteriana contra cinco destas bactérias, pelo menos. Separação e purificação dos componentes voláteis de *P. hispidinervium* e *A. rosaeodora* levaram a identificação de safrol e linalol, respectivamente, como sendo os responsáveis por esta atividade antimicrobiana. Quanto ao óleo de *A. speciosa*, face a multiplicidade de constituintes na mistura, mesmo tendo-se conhecimento de sua composição química, não foi possível relacioná-los à atividade antibacteriana observada.

INTRODUÇÃO

O trabalho teve como finalidade promover ensaios antimicrobianos em óleos essenciais obtidos de espécies vegetais odoríferas usadas em produtos regionais, tipo perfumes e saquinhos de cheiro artesanais, que possuem ação desinfetante natural em bens domésticos, tais como, armários, roupas, livros, etc. Estes produtos integram o comércio existente nas principais cidades da região, em especial na cidade de Belém. Na prática têm-se observado que preparações aromáticas, usadas com este fim, apresentam propriedades antibacterianas e antifúngicas. Parâmetros ambientais, tais como, o alto grau de umidade e a elevada temperatura da região, determinam condições adequadas para o desenvolvimento de microorganismos. No entanto, estes parâmetros não são determinantes na conservação de bens domésticos, quando expostos a ação de microorganismos, se mantidos na presença de produtos odoríferos regionais.

(*) Universidade Federal do Pará, Faculdade de Farmácia

(**) Universidade Federal do Pará, Belém-PA, Departamento de Química

(***) Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém - PA, Departamento de Botânica.

A propriedade germicida de óleos essenciais é por demais conhecida. Dyche-Teague (1924) e Bryant (1924) verificaram que óleos perfumados eliminam bactérias patogênicas secretadas pelas vias nasais. Penfold e Grant (1923-1927) estudaram sistematicamente as propriedades desinfetantes de óleos essenciais australianos. Chofra *et al.* (1960) analisaram alguns óleos essenciais de plantas medicinais indianas quanto a sua eficácia antimicrobiana, usando o método do disco de papel de filtro para medir zonas de inibição. Maruzzella e Henry (1958) e Maruzzella (1963) investigaram a atividade de um número elevado de óleos contra bactérias e fungos, em diferentes diluições e períodos de tempo previamente estabelecidos. Rao e Nigam (1970) usaram o método de difusão de agar para determinar a eficiência antimicrobiana *in vitro* de óleos essenciais. Jain e Kar (1972) sugerem o uso de óleos essenciais com atividade bactericida para compor preparações dermatológicas. Farnsworth (1966) publicou artigo de revisão relacionado com uma triagem biológica e fitoquímica de plantas medicinais e, entre, várias produtoras de óleos essenciais.

Nesta etapa quatorze espécies vegetais foram selecionadas, dando ênfase àquelas mais difundidas nas cidades de Belém e Manaus. Para os ensaios bacteriológicos utilizou-se nove cepas de bactérias patogênicas, responsáveis por infecções comuns.

PARTE EXPERIMENTAL

Material das plantas

A Tabela 1 apresenta dados de coleta e extração, relativos a identificação botânica, nome vulgar da planta, órgão utilizado para a extração, local de coleta e rendimento em óleo essencial. Exemplares das espécies vegetais estudadas encontram-se registrados e mantidos nos herbários do INPA, em Manaus, e do MPEG, em Belém. O material moído e parcialmente seco, foi submetido a hidrodestilação com vapor, de acordo com técnica tradicional (Guenther, 1952). Os óleos essenciais obtidos foram secos na presença de sulfato de sódio anidro, transferidos para ampolas escuras, fechadas em atmosfera de nitrogênio e, mantidas em ambiente refrigerado.

Análise dos óleos essenciais

Os óleos essenciais de *P. hispidinervium*, *A. rosaeodora* e *A. speciosa* foram submetidos a análise por CG Carlo Erba 3160, com ionização de chama, usando uma coluna de sílica, de 0,25 µm de SE-54. Hidrogênio foi usado como gás de arraste, regulado para fornecer uma velocidade linear de 33 cm/seg (medidos a 150°C) e fluxo compatível com a relação 20:1. Injeção de 2 µl no modo "splitless" foi efetuada usando-se uma solução em n-hexano na proporção de 1:1000, seguida de um intervalo de 30 seg para purgar o solvente. A injeção foi feita com a temperatura do forno em 50°C. Após os 3 min iniciais, a temperatura foi programada para fornecer 6°C/min até 230°. As frações 7-8, 10-11 e 14-15 de *P. hispidinervium* e 19-24, 29-37 e 38-57 de *A. rosaeodora* obtidas da separação em coluna de sílica, foram analisadas em Varian 2440, com ionização de chama, usando uma coluna de aço inoxidável de 3,0 x 0,32 m, empacotada com DEGS (10%) em Chromosorb W/AW. Nitrogênio foi usado como gás de arraste com fluxo de 30 ml/min. Injeção de 1 µl da fração bruta foi efetuada no modo "flash vaporization". A injeção foi feita com a tempera

tura do forno a 170°C. Os óleos essenciais foram submetidos à análise em um sistema CG/EM Finnigan 4000 com sistema de dados INCOS. Uma coluna capilar de sílica, idêntica àquela usada na análise por CG, foi instalada a partir de um separador tipo Grob e, ligada diretamente a fonte de íons do EM. Hélio foi usado como gás de arraste. O modo de injeção e o programa de temperatura foram os mesmos empregados no CG, exceto a adoção de um gradiente de 4°C/min. O EM foi operado por impacto eletrônico, a 70ev. O filtro do quadropolo varreu a faixa de 34 a 434 daltons, a cada segundo, e os dados espectrais resultantes foram inseridos em discos para posterior re-exame. O sistema CG/EM utilizou um programa interpretativo automático, denominado ÓLEO (Ramos et al., 1989), contendo dados de espectros de massa e tempos de retenção relativos de substâncias-padrão autênticas. Os óleos essenciais de *P. hispidinervium* e *A. rosaeodora* (0,8 e 0,9g, respectivamente) foram submetidos a separação cromatográfica em coluna de sílica, usando-se como eluente: n-hexano e n-hexano + acetato de etila (8:2). De *P. hispidinervium* obtiveram-se 60 frações que foram reunidas em 3 grupos (determinados por cromatografia em camada fina) denominados 7-8, 10-11 e 14-15. De *A. rosaeodora*, por processo semelhante, obtiveram-se 57 frações que, por sua vez, forneceram os grupos 19-24, 29-37 e 38-57.

Tabela 1. Espécies vegetais: dados de coleta da planta e de extração do óleo essencial:

Nº Reg.	Nome Científico	Nome Vulgar	Órgão da Planta	Local de Coleta	Óleo (%)
055	<i>Eupatorium maximilianii</i> (Asteraceae)	Erva de São João	Folhas	Estrada Tarumã, Manaus (AM)	0,5
049	<i>Stenocalyx michelii</i> (Myrtaceae)	Pitanga	Folhas	Cidade de Manaus (AM)	1,2
151	<i>Capytranthus spruceana</i> (Myrtaceae)	Laranjinha	Folhas	Rio Ariaú, Alto Rio Negro (Am)	1,8
114	<i>Piper aduncum</i> (Piperaceae)	Pimenta longa	Folhas	Rod. Manaus/Caracaraí, km 20	0,4
023	<i>Piper hispídinervium</i> (Piperaceae)	Pimenta longa	Folhas	Rod. Manaus/Caracarái, km 60	2,7
067	<i>Piper hostmanianum</i> (Piperaceae)	Pimenta branca	Folhas	Rod. Manaus/Itacoatiara, km 10	0,9
097	<i>Piper marginatum</i> (Piperaceae)	Caapeba miúda	Folhas	Itacoatiara (Am)	0,7
059	<i>Annona ambotay</i> (Annonaceae)	Envirataia	Cascas	Estrada Tarumã, Manaus (Am)	0,5
064	<i>Siparuna cuspidata</i> (Monimiaceae)	Capitiú	Folhas	Rod. Manaus/Porto Velho, km 30	0,4
099	<i>Siparuna amazonica</i> (Monimiaceae)	Capitiú	Folhas	Rod. Manaus/Itacoatiara, km 16	0,3
113	<i>Tetrameranthus duchei</i> (Annonaceae)	Envira branca	Cascas	Rod. Manaus/Itacoatiara, km 14	0,3
071	<i>Alpinia speciosa</i> (Zingiberaceae)	Vindicá	Folhas	Cidade de Manaus (Am)	0,3
019	<i>Ocimum micranthum</i> (Lamiaceae)	Alfavaca de campo	Erva	Aripuanã, Dardanelos (MT)	0,7
M93	<i>Aniba rosaeodora</i> (Lauraceae)				

Ensaio antimicrobiano dos óleos essenciais

A Tabela 2 apresenta as cepas de bactérias patogênicas utilizadas.

Tabela 2. Cepas de bactérias utilizadas nos ensaios.

Gram positivas	Gram negativas
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Proteus mirabilis</i>
	<i>Proteus vulgaris</i>
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Edwardsiella tarda</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Enterobacter aerogenes</i>
	<i>Salmonella</i> sp.

Os microorganismos mantidos em meio agar nutriente padronizado foram repicados 18 horas antes de se iniciar o ensaio, obtendo-se uma suspensão bacteriana até turvação idêntica à do tubo nº 2 da Escala de MacFarland (6×10^8 microorganismos por mililitro) (Lima et al., 1969). Discos de papel de 6 mm de diâmetro foram imersos no óleo essencial concentrado, não esterilizado, por 5 segundos. Em seguida foram secos a temperatura ambiente e aplicados sobre agar inoculado das placas de análise. Utilizou-se o método de plantio em profundidade "Pour/Plate" (Jawetz et al., 1968). As placas para análise foram encubadas a 37°C, por um período de 18 horas. A leitura foi feita medindo-se o tamanho do halo de inibição formado em volta dos discos. Ensaio bacteriológico foram feitos com os óleos essenciais, também em concentrações diluídas de 1,0 mg/ml; 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml; 0,125 mg/ml e 0,625 mg/ml. As frações obtidas da separação cromatográfica em coluna de sílica foram submetidas aos ensaios bacteriológicos, utilizando-se a mesma metodologia.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos quatorze óleos essenciais testados, três apresentaram atividade antimicrobiana significativa. O óleo de *P. hispidinervium* inibiu o crescimento de cinco diferentes tipos de bactérias. Os óleos de *A. rosaeodora* e *A. speciosa* mostraram halos de inibição para oito das nove bactérias ensaiadas, sendo que o óleo de *A. rosaeodora* foi mais efetivo. Os resultados destes ensaios estão registrados na Tabela 3.

Tabela 3. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais.

Bactérias	Óleos essenciais													
	055	049	151	114	023	067	097	059	064	099	113	071	019	M93
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	++
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	++
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	++
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	++
<i>Salmonella</i> sp.	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+

+ = halos de 0,7 a 14 mm; ++ = halos superiores a 14 mm; - = ausência de halos.

Quanto aos óleos de *P. hispidinervium* e *A. rosaeodora*, sabia-se previamente que safról e linalol, respectivamente, predominavam entre os demais constituintes voláteis existentes nas misturas (Maia *et al.*, 1987; Morais *et al.*, 1972). No óleo de *A. speciosa*, por sua vez, a proporção de seus componentes químicos na mistura é mais heterogênea, distinguindo-se especialmente 1,8-cineol e 4-terpineol (Luz *et al.*, 1984).

No caso de *P. hispidinervium* comprovou-se que o responsável pela atividade bacteriana é o safról, constituinte único das frações 7-8 e componente principal das duas outras frações testadas (10-11 e 14-15). É provável que o efeito antibacteriano observado esteja sendo potencializado pela presença de pequena quantidade de um derivado do mentol não identificado e, também, pelo δ -elemento, devido ter sido mais forte nas frações 10-11 e 14-15. O óleo essencial e as frações de *P. hispidinervium* não foram ativos contra *Pseudomonas aeruginosa*.

Quanto ao tratamento cromatográfico efetuado no óleo de *A. rosaeodora*, observou-se que uma das frações obtidas (19-24) mostrou atividade contra oito das bactérias submetidas aos ensaios antimicrobianos. O único constituinte químico existente nesta fração foi identificado como sendo o linalol e, a semelhança dos testes efetuados com safról, a única bactéria que não produziu halos de inibição foi, novamente, *Pseudomonas aeruginosa*. As demais frações (29-37 e 38-57), além de linalol, continham pequenas quantidades de óxido de linalol e α -terpineol, que ocorrem em menor ou maior proporção no óleo de *A. rosaeodora*, de acordo com a idade da árvore e estação de coleta. A atividade antibacteriana observada para as frações contendo óxido de linalol e α -terpineol, além de linalol, foi menos intensa e apresentou-se de forma irregular entre as bactérias ensaiadas. As Tabelas 4 e 5 apresentam os resultados obtidos com as frações de *P. hispidinervium* e *A. rosaeodora*.

Somente após estes resultados, em consulta a literatura, verificou-se que Kellner e Kober (1955) haviam testado cerca de 175 óleos essenciais a ensaios de ação bactericida,

visando a desinfecção de ambientes domésticos e hospitalares. Entre os grupos de substâncias responsáveis pelas atividades antibacterianas observadas, estavam alcoois mono-terpênicos tipo linalol, geraniol e α -terpinol, além de óxidos como ascaridol e 1,8-cineol. Fenóis tipo timol e carvacrol e alilfenóis tipo eugenol e safrol apresentaram também elevada atividade antimicrobiana.

Tabela 4. Atividade antibacteriana das frações de *Piper hispidinervium*.

Bactérias	Frações		
	7-8	10-11	14-15
<i>Staphylococcus aureus</i>	++	++	++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	+	-	+
<i>Proteus vulgaris</i>	+	-	+
<i>Escherichia coli</i>	+	-	-
<i>Edwardsiella tarda</i>	+	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	++
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	-	++
<i>Salmonella</i> sp.	+	++	-

+ = halos de 0,7 a 14mm; ++ = halos superiores a 14 mm; - = ausência de halos.

Tabela 5. Atividade antibacteriana das frações de *Aniba rosaeodora*.

Bactérias	Frações		
	19-24	29-37	38-57
<i>Staphylococcus aureus</i>	++	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	++	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	+	-	-
<i>Escherichia coli</i>	++	-	++
<i>Edwardsiella tarda</i>	+	-	++
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	++	++	++
<i>Enterobacter aerogenes</i>	++	-	++
<i>Salmonella</i> sp.	++	++	++

+ = halos de 0,7 a 14 mm; ++ = halos superiores a 14 mm; - = ausência de halos.

O óleo de *Alpinia speciosa* não foi submetido ao fracionamento cromatográfico devido a pequena quantidade de material existente e porque este possui um número elevado de constituintes voláteis em sua mistura. Portanto, torna-se difícil atribuir a atividade antimicrobiana desta espécie. No entanto, estão presentes na mistura óxidos e alcoois terpênicos tipo 1,8-cineol, linalol, 4-terpineol, α -terpinol, além de p-cimeno, todos possuindo reputação bactericida, já descrita na literatura.

Os ensaios bacteriológicos realizados com os óleos essenciais, em concentrações diluídas em n-hexano, não apresentaram atividade antimicrobiana

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Dra. Ruth Brazão, do Departamento de Microbiologia da Universidade do Pará, pelo fornecimento das cepas de bactérias usadas e pela franquia de seu laboratório por ocasião dos ensaios antimicrobianos realizados. Este trabalho teve o apoio do CNPq (auxílio à pesquisa).

SUMMARY

Fourteen amazonian plant species, commonly used in the preparation of aromatic waters and household disinfection agents, were selected. Their essential oils were tested for antibacterial activity. The oils of *Piper hispidinervium*, *Aniba rosaeodora* and *Alpinia speciosa* were found to be active against at least five out of nine pathogenic bacteria. Separation of the volatile constituents of the former two species led to safrole and linalol, respectively. The analogous analysis of the oil from *Alpinia* was impossible in view of the complexity of its constitution. Safrole and linalol were shown to be responsible for the antimicrobial activity of the respective essential oils.

Referências bibliográficas

- Bryant, J. J. - 1924. Perf. & Ess. **Oil Record**, 15:1-426.
- Chofra, C. L.; Bhatia, M. C.; Chofra, I. C. - 1960. *In vitro* antibacterial activity of oils from Indian Medicinal Plants. **J. Am. Pharm. Assoc.**, 49:1-780.
- Dyche-Teague, F. C. - 1924. Perf. & Ess. **Oil Record**, 15:1-6.
- Farnsworth, N. R. - 1966. Biological and phytochemical screening of plants. **J. Pharm. Sci.**, 55:1-225.
- Guenther, E. - 1952. **The essential oil**. New York, D. van Nostrand.
- Jain, S. R. & Kar, A. - 1972. The antibacterial activity of some essential oils and their combinations. **Planta Médica**, 20:1-118.
- Jawetz, E.; Melnick, J. K.; Adelberg, E. A. - 1968. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Kelner, W. & Kober, W. - 1955. Möglichkeiten der Verwendung ätherischer Öle zue Raumdesinfektion. **Arzneimittel-Forschung**, 51:1-224.
- Lima, A. O.; Greco, J. B.; Galzzi, J.; Cançado, J. R. - 1969. **Métodos de Laboratório aplicados à clínica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Luz, A. I. R.; Zoghbi, M. C. B.; Ramos, L. S.; Maia, J. G. S.; da Silva, M. L. - 1984. Essential oils of some amazonian Zingiberaceae. Genera *Alpinia* e *Rengalmia*. **J. Nat. Prod.**, 47:1-745.
- Maia, J. G. S.; da Silva, M. L.; Luz, A. I. R.; Zoghbi, M. G. B.; Ramos, L. S. - 1987. Espécies de Piper da Amazônia ricas em safrol. **Química Nova**, 10:1-200.

- Maruzzella, J. C. & Henry, P. A. - 1958. The *in vitro* antibacterial activity of essential oils and oil combination. **J. Am. Pharm. Assoc.**, 47:1-294.
- Maruzzella, J. C. - 1963. Perf. & Ess. **Oil Record**, 54:1-823.
- Morais, A. A. de; Rezende, C. M. A. da M; von Bülow, M. V.; Mourão, J. C.; Gottlieb, O. R.; Marx, M. C.; da Rocha, A. I.; Magalhães, M- T. - 1972. Óleos essenciais de espécies do gênero *Aniba*. **Acta Amazonica**, 2(1):41-46.
- Penfold, A. & Grant, S. - 1923. Perf. & Ess. **Oil Record**, 14:175, 437; 15:127, 388; 16:14; 17:251; 18:100.
- Ramos, L. S.; Maia, J. G. S.; da Silva, M. L.; Luz, A. I. R.; Zoghbi, M. G. B. - 1989. Essential oil analysis by automated matching of mass spectra and relative retention time. [submetido ao **Journal of Fragrance and Flavour**](London).
- Rao, B. G. V. N. & Nigam, S. S. - 1970. The *in vitro* antimicrobial efficiency of some essential oils. **Flavour & Industry**, 1:1-725.

(Aceito para publicação em 21.08.1989)