

## CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS E CASCA DA *Ocotea* sp.(LAURACEAE) COLETADAS NO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL

Eduardo J. Coutinho<sup>1\*</sup>, Érica R. Costa<sup>1</sup>, Gabriela M. Louro<sup>1</sup>, Jaqueline C. M. da Silva<sup>1</sup>, Shaline S. L. Fernandes<sup>1</sup>, Maiara V. O. dos Santos<sup>2</sup>, Marcia R. P. Cabral<sup>3</sup>, Euclésio Simionatto<sup>4</sup>.

1. Estudante de Pós Graduação em Recursos Naturais da UEMS, Dourados/MS.
2. Estudante de Licenciatura em Química da UEMS, Unidade de Naviraí/MS.
3. Estudante de Pós Graduação em Química da Universidade Estadual de Maringá.
4. Docente da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul/UEMS.

### Resumo

O presente trabalho tem como objetivo a extração e caracterização química dos óleos essenciais das folhas e cascas da *Ocotea* sp., coletada no município de Naviraí – MS. As extrações dos óleos essenciais foram realizadas pelo método de hidrodestilação com aparelho Clevenger, no qual obteve um rendimento de 0,23% para o óleo essencial das folhas e 0,34% para o óleo essencial da casca. Os óleos essenciais foram submetidos à análise qualitativa por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM) para identificação dos compostos juntamente com o cálculo do índice de Kovats, sendo o composto majoritário do óleo essencial das folhas o espatulenol e da casca o  $\alpha$ -pineno. Para atividade antimicrobiana foram avaliadas duas bactérias, a *Staphylococcus aureus* gram-positiva e a bactéria *Escherichia coli* gram-negativa, por meio da técnica de disco de difusão em ágar e teste de concentração inibitória mínima (CIM).

**Autorização legal:** Cadastro CGEN AA39FBF

**Palavras-chave:** Cromatografia, Extração, Óleos Voláteis.

### Introdução

Os óleos essenciais são compostos voláteis produzidos pelo metabolismo secundário de uma variedade de plantas, podendo ser extraídos de flores, folhas, casca, raízes e frutos (KAYSER *et al.*, 2019). Os óleos essenciais são ricos em substâncias bioativas, sua composição química é complexa e apresenta uma variedade de constituintes, principalmente compostos monoterpenos, sesquiterpenos e de fenilpropanóides as quais conferem as suas características lipofílicas e organolépticas (ALMEIDA *et al.*, 2018).

As plantas aromáticas são objeto de vastos estudos, onde tem sido possível, através do estudo com óleos voláteis, o isolamento de novas moléculas orgânicas pertencentes à classe dos terpenos. Os efeitos biológicos dos óleos dependem dos princípios ativos que compõem a fração volátil das espécies, entre estes compostos, os terpenóides voláteis, têm mostrado especial interesse, devido a grande variedade de propriedades biológicas exibidas por esta classe de produtos naturais (LOCKWOOD, 2001).

A intensificação do estudo biológico dos constituintes dos óleos resulta na descoberta de produtos naturais que podem ser usados no controle de pragas e doenças, substituindo defensivos agrícolas convencionais que tem causado grandes problemas ao homem e à natureza (GONÇALVES, 2003).

A família botânica Lauraceae está distribuída em regiões tropicais, muitas das suas espécies são economicamente importantes por serem utilizadas na indústria farmacêutica, cosmética, química e alimentícia. O gênero *Ocotea* compreende cerca de 350 espécies em toda América tropical e subtropical, no Brasil ocorre na região sudeste, na mata atlântica da região sul e no Paraguai (FIGUEIREDO *et al.*, 2018).

No presente trabalho efetuou-se a extração dos óleos essenciais das folhas e cascas da espécie *Ocotea* sp. coletadas em Mato Grosso do Sul, juntamente com a caracterização química dos principais constituintes e a avaliação do potencial antimicrobiano destes óleos essenciais.

### Metodologia

As folhas e as cascas da *Ocotea* sp. foram coletadas no Parque Natural Municipal do Córrego Cumandaí, localizado no município de Naviraí no estado de Mato Grosso do Sul, o material foi levado ao laboratório da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, unidade de Naviraí, onde foi preparado para extração.

A extração foi realizada no laboratório de Química Orgânica/Produtos Naturais da UEMS/Naviraí, pelo método de hidrodestilação em aparelho Clevenger. Utilizou-se balão de fundo redondo de 5L, onde o material ficou encoberto por água destilada em aquecimento, por aproximadamente 7 horas.

Após finalizada a extração, água que permaneceu juntamente com o óleo extraído, foi retirada com sulfato de sódio anidro, o rendimento dos óleos foram calculados, e os óleos foram armazenados em frascos de vidro, sob refrigeração.

A análise qualitativa foi realizada em um Cromatógrafo Shimadzu GCMS-QP2010, equipado com uma coluna HP5MS e com biblioteca NIST 32, as condições de análise: razão de divisão do injetor em *split* 1:80, gás de arraste: N<sub>2</sub> (1,2 mL min<sup>-1</sup>); forno cromatográfico 60°C, elevação de 3°C até 240°C, injetor 250°C e detector 250°C.

Para a identificação dos compostos comparou-se à fragmentação do íon molecular dos espectros da

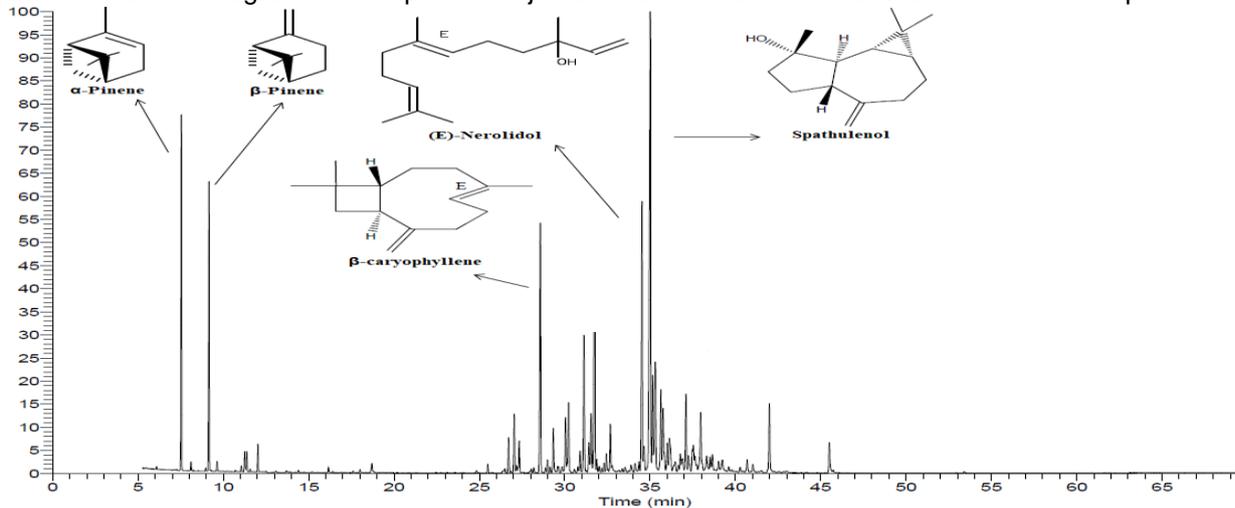
amostra obtido com os espectros da biblioteca NIST do equipamento, calculando também o Índice de Kovats (IK) determinado por meio da injeção de uma série de n-alcenos, C9-C24 injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras de óleo essencial e confirmados através do IK tabelado da literatura Adams (ADAMS, 2017).

Para a avaliação da atividade antimicrobiana foram selecionadas duas bactérias, *Staphylococcus aureus* bactéria gram-positiva e *Escherichia coli* bactéria gram-negativa. Os testes foram realizados no laboratório de microbiologia da UEMS – Unidade de Naviraí. Os óleos essenciais foram submetidos a uma triagem inicial utilizando o método de disco de difusão em ágar segundo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008), com adaptações de HABBAL *et al.*, 2011. Após a triagem para mostrar atividade dos óleos essenciais contra as bactérias gram-positiva e gram-negativa, foi realizado o teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM), utilizando o método de micro diluição em placas, de acordo com FANKAM *et al.*, 2011.

## Resultados e Discussão

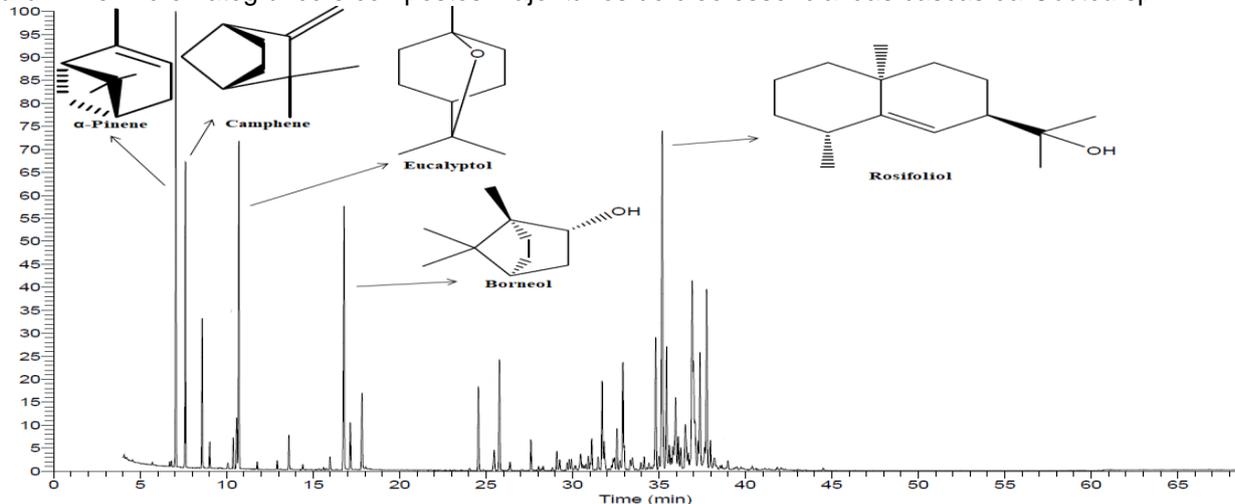
O óleo essencial das folhas da *Ocotea* sp. apresentou um rendimento de 0,23%, já o óleo essencial obtido das cascas apresentou um rendimento de 0,34%. Conforme trabalho de SANTOS, 2016, o rendimento do óleo essencial das folhas da espécie *Ocotea diospyrifolia* (Mez) foi de 2,31% e das cascas um rendimento de 0,22%. A figura 1 mostra o cromatograma obtido por (CG-EM) do óleo essencial das folhas, indicando existir no óleo essencial das folhas uma considerável diversidade de compostos dentre eles monoterpenos e sesquiterpenos, destacando-se como composto majoritário o espatulenol, seguido de  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, (E)-nerolidol e  $\beta$ -cariofileno.

**Figura 1.** Perfil cromatográfico e compostos majoritários do óleo essencial das folhas da *Ocotea* sp.



Para o óleo essencial das cascas podemos observar algumas diferenças na identificação química em relação ao óleo das folhas, além de variações na intensidade dos compostos, que está desmostrado no cromatograma do óleo essencial das cascas (Figura 2). Entre os compostos majoritários deste óleo destaca-se o  $\alpha$ -pineno, seguido de canfeno, eucaliptol, risofoliol e borneol.

**Figura 2.** Perfil cromatográfico e compostos majoritários do óleo essencial das cascas da *Ocotea* sp.



Os óleos essenciais das folhas e cascas da *Ocotea* sp. foram submetidos a uma triagem inicial utilizando o método de disco difusão em ágar, onde foi possível visualizar a formação de halos após a incubação. A interpretação dos resultados como resistente, intermediário e sensível para as bactérias testadas

pode ser observada na tabela 1.

**Tabela 1.** Valores de halo de inibição para o padrão – antibiótico clorafenicol

Padrão	Resistente	Intermediário	Sensível
CLORAFENICOL	≤ 12 mm	13-17 mm	≥ 18 mm

**Tabela 2.** Valores de halo de inibição e interpretação das bactérias testadas

Bactérias	Halo de inibição OE Folha (mm)	Halo de inibição OE Casca (mm)	Controle positivo (mm)	Interpretação Folha / Casca
<i>Escherichia coli</i>	20,34	8,31	32,05	S / R
<i>Staphylococcus aureus</i>	18,65	18,18	27,27	S / S

**Legenda:** R= Resistente, I= Intermediário, S= Sensível

A interpretação dos resultados como resistente, intermediário e sensível para as bactérias testadas (Tabela 2), foi feita baseando nos valores padrão (Tabela 1) do antibiótico clorafenicol (Controle positivo) de acordo com a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005).

Em seguida realizou-se o teste de concentração inibitória mínima (CIM) com as bactérias *S. aureus* e *E. coli*. De acordo com a literatura os óleos essenciais com CIM até 500 µg.mL<sup>-1</sup> são considerados com forte atividade antimicrobiana, com o CIM entre 600 a 1600 µg.mL<sup>-1</sup> possuem atividade moderada e CIM acima de 1600 µg.mL<sup>-1</sup> é considerado com atividade fraca (SARTORATTO, 2004).

**Tabela 3.** Concentração dos óleos essenciais das folhas e cascas da *Ocotea* sp. necessário para inibir o crescimento das bactérias (CIM)

Bactérias	CIM Folha µg.mL <sup>-1</sup>	CIM Casca µg.mL <sup>-1</sup>	Interpretação Folha / Casca
<i>Escherichia coli</i>	18000	4500	Fraca / Fraca
<i>Staphylococcus aureus</i>	2250	148	Fraca / Forte

**Legenda:** Forte= até 500 µg.mL<sup>-1</sup>, Moderada= 600 a 1600 µg.mL<sup>-1</sup>, Fraca= > 1600 µg.mL<sup>-1</sup>

### Conclusões

Os rendimentos obtidos pelas extrações dos óleos são considerados bons, visando aplicações destes óleos. O perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas da *Ocotea* sp. indica uma diversidade compostos entre eles monoterpenos e sesquiterpenos, sendo que os compostos sesquiterpenos estão em maior concentração. No perfil cromatográfico do óleo essencial das cascas da *Ocotea* sp. pode-se observar algumas diferenças, em relação ao óleo essencial das folhas, sendo evidenciado uma maior concentração de monoterpenos. O composto  $\alpha$ -pineno pode ser encontrado tanto no óleo essencial das folhas como no óleo essencial das cascas, enquanto que os demais componentes majoritário das cascas são diferentes dos encontrados no óleo essencial das folhas.

Os óleos essenciais foram submetidos a uma triagem (disco difusão em ágar) para verificação da atividade dos óleos frente a dois tipos de bactérias, *S.aureus* gram-positiva e *E.coli* gram-negativa. A bactéria *E.coli* se mostrou sensibilidade (≥ 18 mm) para óleo essencial das folhas, já para óleo essencial das cascas ocorreu resistência (≤ 12 mm) dessa bactéria. A bactéria *S.aureus* mostrou sensibilidade (≥ 18 mm) para os dois óleos essenciais. Para teste de CIM também foram utilizadas as bactérias *E.coli* e *S.aureus*, nesse teste verificamos a concentração necessária para inibição das bactérias testadas, o óleo essencial das folhas mostrou fraca atividade frente às duas bactérias testadas necessitando de uma maior concentração para ocorrer à inibição das bactérias, para o óleo essencial das cascas tivemos fraca atividade para a bactéria *E.coli* e forte atividade para bactéria *S.aureus*.

### Referências bibliográficas

ADAMS R.P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry**, 4.1 ed, Carol Stream, IL: Allured Publishing Corp., 2017.

ALMEIDA W.S.; LIMA S.G.; BARRETO H.M.; ANDRADE L.M.S.; FONSECA L.; SOBRINHO C.A.; SANTOS A.R.B.; MURATORI M.C.S. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia lasiocalycina* Cham. (Verbenaceae). **Industrial Crops & Products**, v. 125, p. 236-240, 2018.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Normas de desempenho para teste de sensibilidade antimicrobiana**. ANVISA, 2008. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/servicos/audite/manuais/clsi.asp>> Acesso em: 20, Fevereiro 2019.

FANKAN A.G.; KUETE V.; VOUKENG I.K.; KUIATE J.R.; PAGES J.M. Antibacterial Activities of selected Camerronian spices and their synergistic effects with antibiotics against multidrug-resistant phenotypes. **BMC Complement Altern Med**, v. 11, p. 104, 2011.

FIGUEIREDO A.; NASCIMENTO L.M.; LOPES L.G.; GIGLIOTI R.; ALBUQUERQUE R.D.D.G.; SANTOS M.G.; FALCAO D.Q.; NOGUEIRA J.A.P.; ROCHA L.; CHAGAS A.C.S. First report of the effect of *Ocotea elegans* essential oil on *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus. **Veterinary Parasitology**, v. 252, p. 131-136, 2018.

GONÇALVES F.J.T.; **Atividades Antagonista de Óleos Essenciais sobre o Nematóide das Galhas Meloidogyne incógnita (KOFID & WHITE) CHITWOOD**. 2003. Monografia (Graduando em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE, 2003.

HABBAL, O.; EL-HAG, A.H.; AL-MAHROOQI, Z.; AL-HASHMI, N.; AL-BIMANI, Z.; AL-BALUSHI, M.S.; AL-JABRI, A.A. Antibacterial activity of *Lawsonia inermis* Linn (Henna) against *Pseudomas aeruginosa*. **Asian Pac J Trop Biomed**, v. 1, n. 3, p. 173-176, 2011.

KAYSER O.; EL-GAMAL A.; AATI H. Chemical composition and biological of the essential oil from the root of *Jatropha pelargoniifolia* Courb. Native to Saudi Arabia. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, p. 88-95, 2019.

LOCKWOOD G.B. Techniques for gas chromatography of volatile terpenoids from a range of matrices. **Journal of Chromatography**, v. 936, n. 1, 2, p. 23-31, 2001.

SANTOS E.O. **Composição química do óleo essencial da *Ocotea diospyrifolia* (Mez) (Lauraceae) a ação sinérgica**. 2016. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Recursos Naturais, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados – MS, 2016.

SARTORATTO A.; MACHADO A.L.M.; DELARMEINA C.; FIGUEIRA G.M.; DUARTE M.C.T.; REHDER V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.