

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia origanoides* E DO TIMOL

**Autor(es): Marcelle Melo Magalhães<sup>1</sup>; Júlio Cesar Sousa Prado<sup>1</sup>; Rita Ingrid Fernandes de Sousa<sup>2</sup>; Francisca Lidiane Linhares de Aguiar<sup>3</sup>; Raquel Oliveira dos Santos Fontenele<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Pós graduanda em Ciências da Saúde, PPGCS, UFC; E-mail: [marcelle2mm@hotmail.com](mailto:marcelle2mm@hotmail.com),

<sup>2</sup>Discente do Curso de Ciências Biológicas - UVA

<sup>3</sup>Pós-doutoranda- Centro de Ciências Agrárias e Biológicas - UVA; E-mail: [lidianelinhares@yahoo.com.br](mailto:lidianelinhares@yahoo.com.br)

<sup>4</sup>Docente/pesquisador, PPGCS, UFC. E-mail: [raquelbios@yahoo.com.br](mailto:raquelbios@yahoo.com.br).

**Resumo:** O óleo essencial da *Lippia origanoides* apresenta diversos compostos em sua composição química que podem atuar sinergicamente possibilitando excelentes atividades antimicrobianas. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar e comparar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *L. origanoides* e do seu composto majoritário contra diferentes microorganismos. Para tanto foram utilizadas as cepas padrão de *E. faecalis* (ATCC 29212) e *C. albicans* (ATCC 90028) para os ensaios de microdiluição em caldo. O óleo apresentou CIMs de 1,25 mg/mL para *E. faecalis* e 0,078 mg/mL para *C. albicans*. Enquanto o timol não apresentou atividade antibacteriana para *E. faecalis* e CIM de 0,312 mg/ml para *C. albicans*. A ausência de atividade do timol para *E. faecalis* e CIM maior apresentada para *C. albicans* evidencia que o sinergismo entre os outros compostos que promove a atividade contra esses microrganismos. Esse estudo mostra a importância do estudo de produtos naturais para combater microrganismos de importância clínica.

**Palavras-chave:** hidrodestilação, microdiluição, produtos naturais, sinergismo.

### 1. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são produtos naturais conhecidos por sua ampla atividade antimicrobiana, são substâncias voláteis que podem ser obtidas de diversas partes da planta, como flores, folhas, galhos, cascas, frutos e raízes (BAKKALI *et al*, 2007). Esses compostos apresentam excelentes propriedades, como biocompatibilidade, boas propriedades biológicas, propriedades físicas favoráveis, e ótimo custo-benefício, podendo ser empregado como antimicrobianos, analgésicos, sedativos e anti-inflamatórios (SANTOS *et al*, 2007)

A *Lippia origanoides*, comumente conhecida como “alecrim pimenta” é um arbusto da família verbanaceae encontrado na região nordeste brasileira. Suas folhas produzem óleo essencial que apresentam em sua composição química diferentes compostos que atuam sinergicamente possibilitando excelentes atividades antimicrobianas (FONTENELLE *et al.*, 2007; MELO *et al.*, 2019). O timol, de acordo com a literatura, é o constituinte majoritário do óleo essencial das folhas, corresponde a um monoterpene fenólico que apresenta ampla



UNIVERSIDADE ESTADUAL  
VALE DO ACARAÚ

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PRPPG



**CEARÁ**  
GOVERNO DO ESTADO  
SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA  
E EDUCAÇÃO SUPERIOR

atividade antimicrobiana e analgésica, sendo a atividade do óleo essencial da *Lippia origanoides* (OELO) associada a esse composto (OZEN *et al.*, 2011; VERAS *et al.*, 2012).

O *Enterococcus faecalis*, uma bactéria gram-positiva, anaeróbica facultativa e a *Candida albicans*, são espécies que apresentam a capacidade de formação de biofilme e estão associadas a infecções persistentes, são considerados patógenos oportunistas e que comumente se torna resistentes as terapias utilizadas devido a capacidade de sobreviver em ambientes pobres de nutrientes, em elevados níveis de pH e altas temperaturas (SMITH *et al.*, 2015; ALGHAMDI; SHAKIR, 2020; YOO *et al.*, 2020).

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar e comparar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *L. origanoides* e do seu composto majoritário contra *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção dos compostos

As folhas da planta *Lippia origanoides* foram coletadas na região da Pedra da Andorinha, localizada em um distrito de Santa Quitéria, á 87,8 km da cidade de Sobral, Ceará, Brasil. As folhas coletadas foram autenticadas e um espécime de comprovante foi depositado no Herbário Professor Francisco José de Abreu Matos (HUVA). As folhas frescas foram maceradas e submetidas à hidrodestilação por 2 h em aparelho do tipo Clevenger modificado para obter o óleo essencial, já o seu composto majoritario, o timol, foi adquirido comercialmente (Sigma-Aldrich).

### 2.2 Análise dos constituintes químicos por GC-MS

A análise dos constituintes químicos do óleo essencial de *Lippia origanoides* foi obtido por cromatografia gasosa, utilizando o equipamento Shimadzu (GC-2010 plus), com impacto de elétrons a 70 eV, coluna RTX-5MS metilpolissiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Restek), modo de injeção com divisão de fluxo 1:100, gás carreador hélio com fluxo 1,00 mL.min<sup>-1</sup>, temperatura do injetor 250 °C, temperatura da linha de transferência de 250 °C e fonte de íons a 230 °C. Utilizou-se a seguinte programação no forno cromatográfico: temperatura inicial de 70 °C, com rampa de aquecimento de 4 °C.min<sup>-1</sup> até 180 °C e acréscimo de 10 °C/min até 250 °C ao término da corrida (34,5 min). A identificação dos compostos foi realizada pela análise dos padrões de fragmentação exibidos nos espectros de massa com aqueles presentes na base de



UNIVERSIDADE ESTADUAL  
VALE DO ACARAÚ

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PRPPG



**CEARÁ**  
GOVERNO DO ESTADO  
SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA  
E EDUCAÇÃO SUPERIOR

dados fornecida pelo equipamento, cálculos dos índices de retenção (IR) e dados publicados na literatura (ADAMS, 2017).

### 2.3 Cepas e condições de cultura

Foram utilizadas cepas da bactéria gram-positiva e facultativa, *Enterococcus faecalis*: ATCC® 29212™ (isolado da urina) e cepa da levedura de *Candida albicans*: ATCC® 90028™. Os estoques microbianos foram conservados em meio BHI (Brain Heart Infusion – Difco) com glicerol a 20%. Para reativá-las foram realizadas culturas *overnight* para viabilização das cepas microbianas. Inoculou-se 100 µL de cada cepa em frascos contendo 10 mL de caldo BHI para *E. faecalis* e 10 ml de caldo sabouraud para *C. albicans*, em duplicata e incubados à 37° C. Após a reativação, as cepas foram semeadas em ágar BHI e ágar Sabouraud, respectivamente.

Para a confecção do inóculo de *E. faecalis* e *C. albicans*, a pureza da cultura foi verificada e o inóculo padronizado para uma densidade óptica de 0,5 na escala de McFarland, para uma turbidez equivalente a um crescimento de  $1 \times 10^8$  UFC/mL e  $1 \times 10^6$  UFC/mL, respectivamente.

### 2.4 Preparação da substância teste para ensaios antimicrobianos

Para os testes, o OELO e o timol foram devidamente solubilizados em meio de cultura com 5% de Tween à concentração de  $10 \text{ mg. mL}^{-1}$  previamente ao uso

### 2.5 Obtenção da concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) para cada microrganismo foi considerada como sendo a concentração mais baixa do óleo que mostre uma inibição completa do crescimento bacteriano visível. Os efeitos antibacterianos foram avaliados através de um teste de microdiluição em placas de poliestireno de 96 poços com “fundo U”.

Primeiro, os poços foram preenchidos com 100µL de meio BHI e em seguida adicionado 100µL dos compostos na primeira linha para realização da diluição seriada, obtendo diferentes concentrações. Por fim será adicionado a suspensão bacteriana de *E. faecalis* a  $1 \times 10^8$  UFC/mL e de *C. albicans*  $1 \times 10^6$  UFC/mL, de acordo com a norma M27-A3 do CLSI (CLSI, 2008), obtendo-se um volume final de 200µL por poço. As placas foram incubadas por 24 horas a 37° C. Para ambos os testes se utilizou meio de cultura com inóculo e meio de cultura para o controle positivo e negativo, respectivamente

### 2.6 Obtenção da concentração bactericida mínima (CBM)

A CBM foi considerada como sendo a menor concentração de compostos capaz de inibir completamente o crescimento microbiano nas placas. Para determinar essa concentração, 10µL de cada poço em que o crescimento bacteriano não foi visível foram inoculados em placas petri contendo ágar BHI para avaliar o crescimento de *E. faecalis* e ágar sabouraud para avaliar o crescimento de *C. albicans*. Foram incubados a 37° C por 24 horas. Após esse período as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da cromatografia gasosa foi possível identificar os constituintes do óleo essencial, sendo possível detectar o timol como constituinte majoritário (Tabela 1). Além deste, também foi evidenciado a presença de outros 7 constituintes, corroborando com achados da literatura, que mostram uma composição química variada porem com predomínio do timol (BRITO *et al*, 2015; GUIMARÃES *et al*, 2015).

**Tabela 1. Composição química do OE de *Lippia origanoides*.**

<b>T<sub>r</sub> (min)</b>	<b>Composto</b>	<b><sup>2</sup>IR<sub>calc</sub></b>	<b><sup>3</sup>IR<sub>lit</sub></b>	<b>Área (%)</b>
5,381	α-Pinene	935	932	0,45
6,678	Myrcene	999	988	3,23
7,639	p-Cymene	1035	1020	9,68
7,751	Eucalyptol	1039	1026	0,39
14,112	Thymol methyl ether	1252	1232	0,90
16,145	Thymol	1316	1289	80,02
20,558	β-Caryophyllene	1456	1417	3,65
25,838	Caryophyllene oxide	1635	1582	1,68
<b>Composição Total</b>				<b>100.00</b>

<sup>1</sup>Valores de IR calculado.

<sup>2</sup>Valores de IR da literatura (DOOL; KRATZ, 1963).

Os resultados obtidos quanto a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia Origanoides* e de seu composto majoritário estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2- CIM e CBM após exposição de cepas padrão de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* a diferentes concentrações dos compostos

Composto	<i>Enterococcus Faecalis</i> (ATCC 29212)		<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)	
	CIM (mg/ml)	CMM (mg/ml)	CIM (mg/ml)	CMM (mg/ml)
<i>Lippia Origanoides</i>	1,25	2,50	0,078	0,625
Timol	-	-	0,312	0,312

Os dados obtidos evidenciam que o óleo essencial apresentou atividade antimicrobiana frente as duas cepas testadas, entretanto, o seu composto majoritário só apresentou eficácia frente a cepa de *C. albicans*. A ausência de atividade do timol para *E. faecalis* e CIM maior apresentada para *C. albicans* em relação ao óleo mostra que apesar do OELO ser composto em torno de 80% por timol, é o sinergismo entre os outros compostos que promove a atividade contra esses microrganismos

Além disso, de acordo com a literatura, bactérias Gram positivas apresentam maior susceptibilidade aos produtos naturais o que diverge dos achados desse estudo, no qual foi possível observar que apenas o óleo essencial apresentou atividade contra *Enterococcus faecalis* (VERAS et al, 2012). O *E. faecalis* é uma bactéria gram-positiva que está associada a infecções persistentes, apresenta características como não necessitar de suporte para sua sobrevivência, sobreviver a elevados níveis de pH, a altas temperaturas e em ambientes pobres de nutrientes, o que corrobora para resistência a terapias antimicrobiana (PRADA et al., 2019; YOO et al., 2020).

Além de inibir o crescimento, o óleo essencial apresentou atividade bactericida e fungicida. O CMM encontrado mostram valores bem próximos do CIM, para *E. faecalis* o CMM foi de 2,50 mg/ml e o CIM foi 1,25 mg/ml, já para *C. albicans* foi de 0,625 e 0,078 respectivamente, evidenciando atividade antimicrobiana considerável, assim como no estudo de Silva et al. (2022).

Quanto a atividade fúngica, o CIM do composto majoritário foi maior quando comparado ao do óleo essencial, indicando uma maior potência do OELO frente a *Candida albicans*. A atividade antifúngica do OELO e seu composto majoritario também foram evidenciados nos estudos de Brito et al (2015), que além de atuar na inibição do crescimento e erradicação dos microorganismos, foram capazes de neutralizar a formação de hifas e pseudohifas verificado na condição patogênica da candidíase.

## CONCLUSÃO

O óleo essencial da *Lippia origanoides* apresentou potencial atividade antifúngica e antibacteriana frente as cepas testadas, já o seu composto majoritário teve potencial atividade antifúngica. Diante disso, considera-se estes compostos promissores agentes antimicrobianos. Por meio desse estudo ressalta-se a importância do estudo de produtos naturais para combater microrganismos de importância clínica, sendo necessário mais estudos como esse para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos a base desses produtos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e a Universidade Vale do Acaraú em nome da professora Dra. Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle pelo apoio, fomento e orientação nessa pesquisa. Além destes, agradeço a pós doutora Francisca Lidiane Linhares de Aguiar por todo suporte e ensinamento.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectroscopy*, 4.1<sup>th</sup> Edition, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA, 2017.

ALGHAMDI F, SHAKIR M. The Influence of *Enterococcus faecalis* as a Dental Root Canal Pathogen on Endodontic Treatment: A Systematic Review. **Cureus**, v.12, n.3, e7257, 2020

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food Chemistry and Toxicology**, v.46, p. 446-75, 2008.

BRITO, D. I. V. et al. Análise fitoquímica e atividade antifúngica do óleo essencial de folhas de *Lippia sidoides* Cham. e do Timol contra cepas de *Candida* spp. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 17, n. 4, p. 836–844, 2015.

DOOL, V. D; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography, 1963.

FONTENELLE R. O. *et al.* Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia origanoides* Cham. **Journal Antimicrob Chemother**, v. 59, n.5, p.934-40, 2007

GUIMARÃES, L. G et al. General Characteristics, Phytochemistry and Pharmacognosy of *Lippia sidoides*. **Nat Prod Commun**. V. 10, n. 11, p.1861-7, 2015.

MELO A.R.B *et al.* *Lippia origanoides* and *Lippia origanoides* essential oils affect the viability, motility and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. **Micron**, 2020

OZEN T.; DEMIRTAS I.; AKSIT H. Determinação das atividades antioxidantes de diversos extratos e composições de óleos essenciais de *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii*. **Química Alimentar**. V. 124, p.58-64, 2011.





UNIVERSIDADE ESTADUAL  
VALE DO ACARAÚ

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PRPPG



**CEARÁ**  
GOVERNO DO ESTADO  
SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA  
E EDUCAÇÃO SUPERIOR

PRADA I. *et al.* Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. **Oral Medicine and Oral Pathology and bucal cirurgy**. v.24, n.3, e364-e372, 2019

SANTOS R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. Em *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. **Editora da UFRGS/UFSC**, Porto Alegre /Florianópolis, 403-443.

SMITH J. R et al.  $\beta$ -Lactam combinations with daptomycin provide synergy against vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. **J Antimicrob Chemother**. V. 70, n. 6, p. 1738-43, 2015.

VERAS H. et al. Topical Antiinflammatory Activity of Essential Oil of *Lippia sidoides* Cham: Possible Mechanism of Action. *Phytoterapy Research*, v. 27, n. 2, p. 179-185

VERAS, H. N. H. et al. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol. *Fitoterapia*, v. 83, n. 3, p. 508–512, 2012.

YOO Y.J *et al.* *C. albicans* Virulence Factors and Pathogenicity for Endodontic Infections. **Microorganisms**, v.8, n.9, p.1300, 2020