

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

CARACTERIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Origanum vulgare* E *Thymus vulgaris*

Nayhara Madeira Guimarães¹, Luciano Menini², Juliana Alves Resende¹,
Janaina Cecília Oliveira Villanova¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alegre - ES, Brasil. nayhara.mg2@gmail.com, ju.alves.resende@gmail.com, pharmacotecnica@yahoo.com.br.

²Programa de Pós-Graduação em Agroecologia (PPGA), Instituto Federal do Espírito Santo (IFES), Alegre - ES, Brasil. lucianomenini10@gmail.com

Resumo

Os óleos essenciais são derivados vegetais que se caracterizam como misturas complexas de substâncias secundárias oriundas do metabolismo das plantas, para os quais há diversas aplicações relatadas nas indústrias de alimentos, cosméticos, produtos de higiene e beleza e, de medicamentos. Entre as atividades terapêuticas relatadas para os óleos essenciais de orégano e tomilho, a antimicrobiana, sobre bactérias e fungos, se destaca. O objetivo deste estudo foi analisar a composição destes óleos essenciais, disponíveis comercialmente, com o intuito de pesquisar a presença de compostos majoritários responsáveis pela atividade antimicrobiana sobre microrganismos causadores de mastite em animais produtores de leite. Para tal, os óleos essenciais foram submetidos a análise por cromatografia gasosa. Foram confirmadas a presença de carvona e carvacrol como majoritários nas amostras de orégano e, de timol e *p*-cimeno nas amostras de tomilho. Tais achados justificam o emprego dos óleos essenciais em formulações farmacêuticas a serem delineadas, preparadas e avaliadas.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana. Carvacrol. Carvona. Timol.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde/Farmácia.

Introdução

Os óleos essenciais (OEs) são líquidos oleosos de origem vegetal, caracterizados quimicamente como misturas complexas de compostos bioativos voláteis, de baixo peso molecular, principalmente, monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides. São produzidos a partir do metabolismo secundário vegetal e podem ser extraídos de folhas, frutos, raízes, sementes, rizomas, flores ou hastes das plantas. Os compostos bioativos presentes em maior proporção nos OEs são ditos majoritários (REIS *et al.*, 2020). A composição química dos OEs varia conforme a espécie, a localização geográfica, as condições climáticas e incidência de luz, a época de colheita, a parte da planta utilizada na extração, o método e o solvente empregados na extração (BAKKALI *et al.*, 2008).

O orégano (*Origanum vulgare*) e o tomilho (*Thymus vulgaris*) são plantas popularmente chamadas de aromáticas devido ao odor característico que exalam. São utilizadas como condimentos na culinária brasileira e são estudadas também para emprego pelas indústrias alimentícia e farmacêutica (CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017; PEIXOTO *et al.*, 2015). Entre os compostos bioativos majoritários de interesse farmacológico presentes nos OEs de orégano e tomilho se destacam o carvacrol e o timol. Outros, presentes em menor proporção são a carvona, *p*-Cimeno, óxido de cariofileno e linalol, entre outros (CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017). Existem vários relatos na literatura sobre a atividade antimicrobiana dos OEs de orégano (OEO) e tomilho (OET), sendo ambos considerados promissores para tratamento e profilaxia da mastite em animais produtores de leite. Alguns autores atribuem a ação antimicrobiana do OEO e do OET à presença de, principalmente, timol, e carvacrol, frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo *Staphylococcus aureus*,

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

principal microrganismo isolado de animais com mastite (AQUINO *et al.* 2010; ČABARKAPA *et al.*, 2019; CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017; PINA *et al.*, 2022).

Uma vez que a atividade farmacológica dos OEs está associada à presença de compostos bioativos, antes da incorporação destes derivados vegetais em formulações, faz-se necessário pesquisar a presença dos componentes de interesse nos OEs. Para tal, a cromatografia gasosa (CG) se destaca como uma das técnicas mais eficazes para analisar a composição qualitativa e quantitativa dos óleos essenciais. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar quimicamente os óleos essenciais de orégano e tomilho obtidos no mercado nacional, utilizando cromatografia gasosa, a fim de determinar os seus componentes majoritários isoladamente e associados para posterior utilização em formulações farmacêuticas com atividade antimicrobiana.

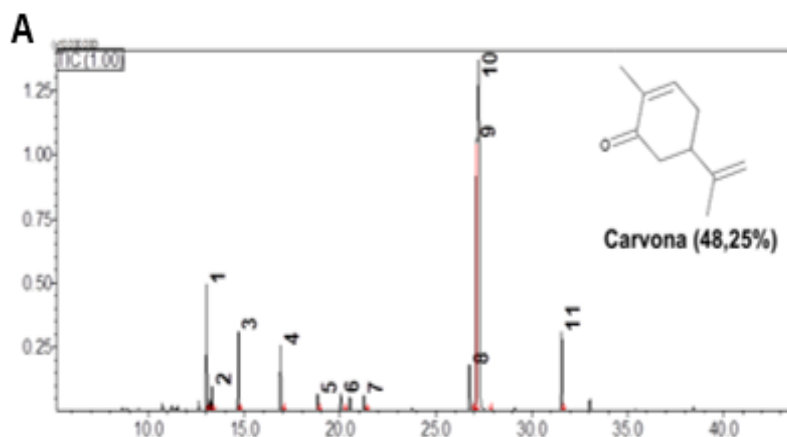
Metodologia

Os OEs foram obtidos comercialmente e, de acordo com informações do fabricante, os OEO e OET foram extraídos pelo método de destilação a vapor e os farmacógenos utilizados foram as folhas e flores, respectivamente. A caracterização química dos componentes presentes nos OEs foi realizada por cromatografia gasosa em conjunto com espectrometria de massa (GCMS), no Laboratório de Química Aplicada do Instituto Federal do Espírito Santo (IFES), localizado no município de Alegre, Espírito Santo, Brasil. Foi empregado cromatógrafo com detector seletivo de massas (SHIMADZU, modelo QP-PLUS-2010). A coluna cromatográfica empregada foi do tipo capilar de sílica, com fase estacionária Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), utilizando gás hélio para arraste. Inicialmente, a temperatura da coluna foi de 60° C, com aumento de 3° C por min, até chegar à temperatura máxima de 240° C. Amostras de 10 mg de cada OE foram diluídas em diclorometano e, em seguida, 1 µL das soluções foram injetadas no capilar. A identificação dos componentes foi realizada pela comparação dos espectros de massas obtidos com os espectros disponíveis no banco de dados das espectrotecas Willey7, NIST05, NIST05s, NIST12 e NIST62 e, por meio do cálculo do índice de retenção (IR). Para o cálculo do IR, foi utilizada uma mistura homóloga de n alcanos lineares (C7 a C40) e o valor calculado para cada composto foi comparado com valores da literatura (ADAMS, 2007). Foram identificados os compostos presentes nos OEs com área relativa superior a 1%.

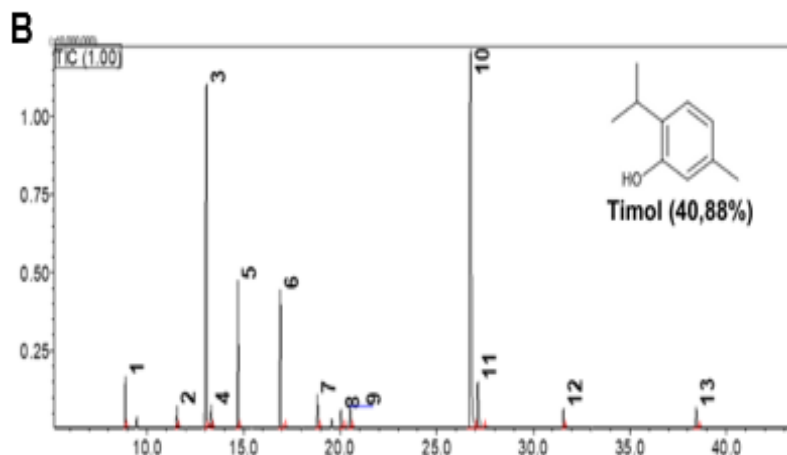
Resultados

No Painel 1 são apresentados os perfis cromatográficos dos OEs de orégano e tomilho.

Painel 1 - Perfis cromatográficos do OE de orégano (A) e de tomilho (B) obtidos por GC/MS.



A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições



Fonte: os autores, 2023.

Na Tabela 1 são dadas as composições detalhadas dos OEs de orégano e tomilho.

Tabela 1 - Composição dos óleos essenciais de orégano e tomilho segundo o índice de retenção (LTPRI) e CG-MS^[a]

Pico	Nome	Área% ^[d]	IR calculado ^[b]	IR tabelado ^[c]
Óleo essencial de orégano				
1	<i>p</i> -cimeno	7,27	1027	1020
2	Eucaliptol	1,51	1033	1026
3	γ -terpineno	4,84	1063	1054
4	Linalol	4,24	1110	1095
5	Cânfora	1,15	1152	1141
6	Borneol	1,30	1178	1165
7	α -terpineol	1,18	1204	1186
8	Timol	3,44	1328	1289
9	Carvacrol	20,97	1337	1298
10	Carvona	48,25	1342	1239
11	(<i>E</i>)-cariofileno	5,85	1445	1417
Óleo essencial de tomilho				
1	α -pineno	2,40	931	932
2	β -mirceno	1,08	994	988
3	<i>p</i> -cimeno	27,36	1028	1020
4	Eucaliptol	1,23	1033	1026
5	γ -terpineno	7,54	1063	1054
6	Linalol	8,05	1111	1095
7	Cânfora	1,97	1152	1141
8	Borneol	1,25	1178	1165
9	Terpinen-4-ol	1,33	1189	1174
10	Timol	40,88	1330	1289
11	Carvacrol	4,06	1339	1298
12	(<i>E</i>)-cariofileno	1,25	1445	1417
13	Óxido de cariofileno	13,60	1621	1582

[a] Compostos identificados pelo índice LTPRI e por CG-MS usando uma coluna Rtx®- 5MS. [b] Calculado usando uma mistura de *n*-alcanos saturados (C7 a C40). [c] Índices tabelados com base em ADAMS, 2007. [d] Área relativa com base no cromatograma da Figura 1, identificados apenas compostos com área relativa > 1%.

Fonte: os autores, 2023.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Discussão

A identificação da presença dos componentes majoritários de interesse nos OEs em uma etapa anterior à pesquisa e uso destes em formulações farmacêuticas é fundamental, uma vez que fatores como variedade da planta, localização geográfica, clima circundante, variações sazonais, estresse durante o crescimento, grau de maturidade da colheita e, condições de secagem e armazenamento pós-colheita, além do tipo de material vegetal usado, do método de extração e o solvente empregado, influenciam na constituição química, interferindo nas propriedades farmacológicas (HUSSAIN *et al.*, 2008; RAUT; KARUPPAYIL, 2014). A técnica GCMS é a de escolha para tal avaliação. O método envolve a introdução da amostra em uma coluna cromatográfica, onde os componentes são separados com base em suas interações entre as fases móvel e estacionária, ocorrendo a volatilização dos compostos. Em seguida, os elementos presentes são detectados. A combinação da cromatografia com a espectrometria de massas possibilita a comparação dos espectros obtidos com aqueles incluídos em bibliotecas disponíveis nos equipamentos, facilitando a identificação dos compostos (COLLINS *et al.*, 2009).

Conforme relatado na literatura, os componentes majoritários identificados nos OEs de orégano e tomilho, responsáveis pela atividade antimicrobiana atribuída a estes, são o carvacrol e o timol (ČABARKAPA *et al.*, 2019; CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017). Estudos relatam também a presença de carvona em teores entre 0,1 e 0,2% nestes derivados vegetais (BERREHAL *et al.* 2010; BE´JAOUI *et al.*, 2013). No presente estudo, a análise dos OEs revelou 11 principais componentes no OEO, com a carvona predominando (48,25%), seguida pelo carvacrol (20,97%) e p-cimeno (7,27%). Já no OET, foram encontrados 13 componentes, com o timol sendo o mais abundante (40,88%), seguido de p-cimeno (27,36%), óxido de cariofileno (13,6%) e do γ -terpineno (7,54%). Os resultados encontrados estão de acordo com outros achados na literatura, exceto para o elevado teor de carvona observado na amostra do OEO. Berrehal *et al.* (2010) e Bejaoui *et al.* (2013) quantificaram a carvona na proporção de 0,1% e 0,21% no OE de orégano. O maior teor de carvona encontrado neste trabalho, ao contrário dos relatos da literatura, pode ser justificado por diferenças nos farmacógenos utilizados, nas técnicas de extração, nos sistemas solventes empregados, e em características das plantas e das condições de cultivo, tais como espécie, localização geográfica, condições climáticas (BAKKALI *et al.*, 2008). A ocorrência de degradação durante o transporte e armazenagem também pode ser responsável pelos resultados divergentes (BAKKALI *et al.*, 2008).

Para os teores de carvacrol e timol em ambos os OEs, há relatos de concordância e divergência na literatura, o que pode ser atribuído aos mesmos motivos indicados para a carvona. Para o OEO, os teores de compostos fenólicos variaram entre 80% e 98%, sendo que o conteúdo do carvacrol variou de 20,14 a 73,90. A proporção de p-cimeno relatada variou entre 2,5 a 19,2% (PENSEL *et al.*, 2014; WALLER *et al.*, 2016). Nas análises do OET, alguns autores destacam a presença do timol como componente majoritário, com proporções variando entre 21 a 65,40%, valores correspondentes ao encontrado no presente estudo (ČABARKAPA *et al.*, 2019; MIRANDA *et al.*, 2015; PENSEL *et al.*, 2014; RIBEIRO, 2015).

Apesar das variações observadas nos teores dos compostos bioativos encontrados nos OEO e OET analisados no presente trabalho quando comparados aos dados disponíveis na literatura, foi confirmada, em ambos, a existência de compostos para os quais há relatos de atividade antimicrobiana sobre bactérias causadoras de mastite bovina (ALMEIDA, 2015; BOUYAHYA *et al.*, 2021; KARACA; DEMIRCI; DEMIRCI, 2018). Albuquerque (2017) avaliou a atividade antimicrobiana e antibiofilme de OEO e OET isolados e associados frente a cepas de *S. aureus* isoladas de mastite bovina, na forma de solução para administração no pós-ordenha. Segundo o autor, os OEs associados apresentaram interação aditiva frente a todas as cepas testadas. Lee *et al.* (2020) relataram que o efeito de uma associação de OEO e OET sobre cepas de *Leuconostoc citreum* foi aditiva, levando ao aumento da atividade antimicrobiana frente ao microrganismo testado. De acordo com os autores a atividade antimicrobiana dos OEs o foi efetiva pela presença dos componentes majoritários carvacrol e timol. Beloni *et al.* (2021) pesquisaram a atividade antimicrobiana do OEO e OET, isolados e em associação, frente a linhagem padrão e clínicas de *S. aureus* isoladas de mastite bovina, resistentes e sensíveis a antimicrobianos. A associação dos OEs foi classificada como aditiva, sendo eles capazes de inibir o crescimento de todas as cepas testadas.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Conclusão

A cromatografia gasosa associada a massas indicou que a carvona e o timol se destacaram como constituintes predominantes nos OEs de orégano e timol, respectivamente. Outros compostos bioativos de interesse identificados foram carvacrol, p-cimeno, γ -terpineno e óxido de cariofileno. A constatação da presença desses compostos bioativos demonstra a potencial aplicabilidade dos OEs de orégano e tomilho em formulações destinadas ao tratamento de mastite bovina em animais produtores de leite, justificando a continuidade do trabalho.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo apoio financeiro e concessão de bolsa de mestrado (Edital Universal TO 03/2021).

Referências

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4th ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, p. 804, 2007.

ALBUQUERQUE, K. R. S. **Atividade antibacteriana e antibiofilme de óleos essenciais sobre estirpes de *Staphylococcus aureus* causadoras da mastite bovina**. 2017. 93 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Aplicada) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.

ALMEIDA, R. R. **Mecanismos de ação dos monoterpenos aromáticos: timol e carvacrol**. 2015. 26 p. Monografia (Graduação em Química) - Curso de Química, Universidade Federal de São João Del-rei, São João Del-Rei, 2015.

AQUINO, L. C. L. *et al.* Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de erva-cidreira e manjerição frente a bactérias de carnes bovinas. **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 4, p. 529-535, 2010.

BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils - a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BE'JAOUI, A. *et al.* Essential Oil Composition and Antibacterial Activity of *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf. at Different Phenological Stages. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 12, p. 1115-1120, 2013.

BELONI, M. V. *et al.* Interações na atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris*. In: **XXV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, XXI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação e XI Encontro de Iniciação à Docência**. Universidade do Vale do Paraíba - 2021.

BERREHAL, D. *et al.* Comparative composition of four essential oils of oregano used in Algerian and Jordanian folk medicine. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 6, p. 957-960, 2010.

BOUYAHYA, A. *et al.* Health Benefits and Pharmacological Properties of Carvone. **Biomolecules**, v. 11, n. 12, p. 1803, 2021.

ČABARKAPA, I. *et al.* Anti-biofilm activities of essential oils rich in carvacrol and thymol against *Salmonella enteritidis*. **Biofouling**, v. 35, n. 3, p. 361-375, 2019.

CHOUHAN, S., SHARMA, K.; GULERIA, S. Antimicrobial activity of some essential oils-present status and future perspectives. **Medicines**, v. 4, n. 58 p. 21, 2017.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

COLLINS, C. H. et al. **Fundamentos cromatográficos**, 6^a. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2009.

HUSSAIN, A. I. et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food chemistry**, v. 108, n. 3, p. 986-995, 2008.

KARACA, N.; DEMIRCI, B.; DEMIRCI, F. Evaluation of *Lavandula stoechas* L. subsp. *stoechas* L., *Mentha spicata* L. subsp. *spicata* L. essential oils and their main components against sinusitis pathogens. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 73, n. 9-10, p. 353-360, 2018.

LEE, S. et al. Synergistic antimicrobial activity of oregano and thyme thymol essential oils against *Leuconostoc citreum* in a laboratory medium and tomato juice. **Food Microbiology**, v. 90, n. 103489, 2020.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Análise comparativa do potencial alelopático do óleo essencial de *thymus vulgaris* e seu constituinte majoritário na germinação e vigor de sementes de alface (*lactuca sativa* L.). **E-xacta**, v. 8, n. 2, p. 45-53, 2015.

PEIXOTO, M. G. et al. Acaricidal activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary parasitology**, v. 210, n. 1, p. 118-122, 2015.

PENSEL, P. E. et al. Efficacy of essential oils of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* on *Echinococcus granulosus*. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2014, p. 12, 2014.

PINA, L. T. S. et al. Carvone and its pharmacological activities: A systematic review. **Phytochemistry**, v. 196, n. 8: 113080, 2022.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial crops and products**, v. 62, p. 250-264, 2014.

REIS, J. B. et al. Evaluation of antimicrobial activity of essential oils against food pathogens. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 1, p. 342-363, 2020.

RIBEIRO, A. D. B. **Uso de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) na dieta de ovinos**. 2015. 96 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal) - Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal, Universidade de São Paulo, Pirassununga, São Paulo, 2015.

WALLER, S.B. et al. *In vitro* susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* to essential oils of *Lamiaceae* family. **Mycopathologia**, v. 181, n. 11-12, p. 857-863, 2016.