

Atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de ho-sho (*Cinnamomum camphora* Ness e Eberm Var. *Linaloolifera fujita*)

Antimicrobial and antioxidant activities of ho-sho (Cinnamomum camphora Ness e Eberm Var. Linaloolifera fujita) essential oil

Rogério Luis CANSIAN¹, Altemir José MOSSI², Débora de OLIVEIRA¹, Geciane TONIAZZO¹, Helen TREICHEL^{1*}, Natalia PAROUL³, Viviane ASTOLFI², Luciana Atti SERAFINI³

Resumo

Este trabalho teve como objetivo determinar a atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de Ho-Sho. O principal componente do óleo essencial obtido a partir de folhas da planta submetidas ao processo de hidrodestilação foi o linalol (80 a 95% m/m). O óleo essencial mostrou atividade antimicrobiana para todos os microrganismos testados, com exceção de *Pseudomonas aeruginosa*. A maior atividade antimicrobiana do óleo essencial sobre as bactérias testadas foi observada sobre *Xanthomonas campestris* (33,0 mm) e a menor sobre *Yersinia enterocolitica* (10,5 mm). Para a concentração inibitória mínima (CIM), observou-se que todos os microrganismos apresentaram-se susceptíveis ao óleo essencial de Ho-Sho. A variação das CIM para as bactérias Gram-positivas foi de 1,00 mg.mL⁻¹ (*Streptococcus mutans*) a 1,75 mg.mL⁻¹ (*Staphylococcus epidermidis*). Já a variação das CIM para as bactérias Gram-negativas foi de 0,625 mg.mL⁻¹ (*Citrobacter freundii*) a 2,50 mg.mL⁻¹ (*Shigella flexneri*). Os resultados obtidos na determinação da atividade antioxidante do óleo essencial demonstram que o percentual antioxidante aumenta proporcionalmente à concentração de óleo essencial adicionado, atingindo o valor máximo de 97,49% de atividade antioxidante para a concentração de 50000 µg.mL⁻¹.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana; atividade antioxidante; *Cinnamomum camphora*.

Abstract

The main objective of this work was to evaluate the antimicrobial and antioxidant activities of the Ho-Sho essential oil. The major component of the essential oil obtained from the leaves submitted to hydro-distillation was linalool (80-95 wt%). The essential oil showed antimicrobial activity for all tested microorganisms, except for *Pseudomonas aeruginosa*. Higher antimicrobial activities over the tested bacterium were observed for *Xanthomonas campestris* (33.0 mm), and lower activities were obtained for *Yersinia enterocolitica* (10.5 mm). For the minimal inhibition concentration (MIC), it was observed that all microorganisms presented susceptibility to the Ho-Sho essential oil. For Gram-positive bacteria, the MIC varied from 1.00 mg.mL⁻¹ (*Streptococcus mutans*) to 1.75 mg.mL⁻¹ (*Staphylococcus epidermidis*). In the case of Gram-negative bacteria, the MIC was 0.625 mg.mL⁻¹ for *Citrobacter freundii* and 2.50 mg.mL⁻¹ for *Shigella flexneri*. The results related to antioxidant activities demonstrated that the antioxidant percentage increases proportionally to the concentration of the essential oil added reaching the maximum value of 97.49% for the essential oil concentration of 50000 µg.mL⁻¹.

Keywords: antimicrobial activity; antioxidant activity; *Cinnamomum camphora*.

1 Introdução

A oxidação de lipídios em produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos, juntamente com o crescimento de microrganismos indesejáveis tem resultado no desenvolvimento de, principalmente, rancidez e deterioração, conduzindo a produtos não aceitáveis para consumo humano. Estima-se que a cada ano aproximadamente 30% da população de países industrializados sofra de doenças relacionadas ao consumo inadequado de alimentos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002). Além disso, a alta produção de radicais livres nos organismos e a peroxidação de gorduras em membranas celulares têm implicado em várias doenças patofisiológicas, incluindo metagênese, diabetes,

arteriosclerose coronária, mal de Alzheimer e cancerogênese, entre outros (FRANCO et al., 2008; RELIENE; SCHIESTL, 2006; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989; SMITH; PERRY; PRYOR, 2002).

Os óleos essenciais possuem grande potencial na moderna nutracêutica, uma vez que estes materiais, além de serem considerados alimentos e fármacos, têm sido usados na prevenção e tratamento de diversas doenças (DEMIRCI et al., 2008; CAVAR et al., 2008; DIPLOCK et al., 1998). O uso destes óleos em fitoterapia está relacionado às atividades de metabólitos secundários, os quais possuem atividades antimicrobiana, espasmolítica, antiviral e anticarcinogênica, entre outros

Recebido para publicação em 3/4/2008

Aceito para publicação em 3/1/2009 (003402)

¹ Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada – URI, Campus de Erechim, Av. Sete de Setembro, CEP 99700-000, 1621, Erechim - RS, Brasil, E-mail: helen@uricer.edu.br

² Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Regional Integrada – URI, Campus de Erechim, Av. Sete de Setembro, CEP 99700-000, 1621, Erechim - RS, Brasil

³ Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul – UCS, Caxias do Sul - RS, Brasil

*A quem a correspondência deve ser enviada

(BUSHBAUER; JIROVETZ, 1994; BRUNETON, 1999). Além disso, muitos óleos essenciais e compostos isolados destes têm sido recentemente reconhecidos como poderosos antioxidantes naturais, os quais poderiam ser utilizados como substitutos potenciais aos antioxidantes sintéticos (RUBERTO; BARATTA, 2000; MIMICA-DUKIC et al., 2003, 2004; BOZIN et al., 2006). Particularmente, a atividade antimicrobiana tem sido considerada a base de várias aplicações, incluindo preservação de alimentos e produção de fármacos alternativos (LIS-BAUCHIN; DEANS, 1997; REDDY et al., 1998; TSIGARIDA; SKANDAMIS; NYCHAS, 2000). Este aspecto assume uma relevância particular devido ao aumento da resistência de algumas bactérias aos antibióticos mais comuns e aos agentes microbianos utilizados na preservação de alimentos (ADAM, 2002).

Desta forma, muitas plantas aromáticas têm sido atualmente consideradas como importantes fontes para a extração de compostos com atividades antioxidante e antimicrobiana. Uma planta originária da China conhecida como Ho-sho (*Cinnamomum camphora* Nees e Eberm Var. *Linaloolifera fujita*) parece ser uma alternativa bastante interessante. O óleo essencial extraído de suas folhas contém entre 90 e 95% de linalol, teores bem acima dos encontrados em pau-rosa e erva-cidreira (FRIZZO et al., 2000).

O linalol é um álcool monoterpênico, largamente utilizado na indústria de alimentos, cosméticos e perfumes. Foi incluído na lista de substâncias classe "A" pelo Conselho Europeu, graças a sua importância como matéria-prima para síntese de compostos de alto valor agregado (LETIZIA et al., 2003).

Dada a importância da espécie na indústria de óleo essencial, o presente trabalho objetivou determinar a atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de Ho-Sho (*Cinnamomum camphora* Nees e Eberm Var. *Linaloolifera fujita*) obtido por hidrodestilação.

2 Material e métodos

2.1 Obtenção e caracterização química do óleo essencial

O óleo essencial do Ho-Sho (*Cinnamomum camphora*) foi obtido por hidrodestilação a partir de folhas adultas de plantas cultivadas na área experimental do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul (IB/UCS) e armazenado a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A análise dos óleos voláteis do Ho-Sho foi realizada por cromatografia gasosa com detector de massas (Shimadzu, Modelo QP 5050A). A amostra utilizada na cromatografia foi preparada a 5000 ppm, sendo o óleo dissolvido em diclorometano (Merck). Foi empregada uma coluna capilar DB-5 (30 m \times 0,25 mm de diâmetro \times 0,25 μm de espessura do filme); vazão do gás de arraste (hélio) de 0,8 mL/minuto; detector em 1,0 Kv; Modo split (1:20); injetor a $280\text{ }^{\circ}\text{C}$; e a interface em $300\text{ }^{\circ}\text{C}$. A programação da temperatura inicial foi realizada a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (3 minutos); com primeira rampa de aquecimento a $4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minutos}$ até $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ e um tempo de corte do solvente de 4 minutos. O tempo total de análise foi de 65,5 minutos. Os picos dos compostos foram integrados de modo manual e a identificação realizada com padrão para o linalol e por comparação dos espectros, dados da literatura

e pelo índice de similaridade no banco de dados (Wiley) do equipamento, para os demais compostos. Os compostos foram listados pelo tempo de retenção e área do pico.

2.2 Atividade antimicrobiana do óleo essencial

Para a realização dos testes antimicrobianos, foram utilizadas duas metodologias: difusão em placas e concentração inibitória mínima (CIM).

Difusão em placas

Nesta etapa foram utilizados dezenove microrganismos, sendo eles bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Sarcina* sp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*) e Gram-negativas (*Acinetobacter* sp., *Aeromonas* sp., *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri*, *Xanthomonas campestris*, *Yersinia enterocolitica*), crescidas previamente em meio Lúria Bentani (10 g.L⁻¹ de triptona, 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 5 g.L⁻¹ de NaCl) durante 24 horas a $36 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Os testes foram realizados pelo método de difusão em discos de papel Whatmann 3 com 7 mm de diâmetro, em placas de Petri com meio de cultura Ágar Müeller-Hinton. As culturas ativas das bactérias foram inoculadas por espalhamento com auxílio da alça de Drigalski estéril, nas placas, num volume de 200 μL (10⁸ UFC.mL). Em cada placa foi depositado um disco de controle negativo (branco), outro de controle positivo contendo 30 μg do antibiótico cloranfenicol, e três discos com 5 μL de óleo essencial. Após a incubação das placas a $36 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, os resultados foram analisados medindo-se o diâmetro do halo de inibição de crescimento das bactérias, incluindo o diâmetro do disco de papel, com o auxílio de um paquímetro.

Os resultados foram expressos em mm pela média aritmética dos valores dos halos obtidos nas três repetições, sendo as médias comparadas por análise de variância seguida de teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o programa SPSS 10.0.1 Standard Version 1989-1999.

Concentração Inibitória Mínima

Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), foi utilizado o método indireto de crescimento bacteriano através da densidade ótica em meio de cultura líquido.

Depois de obtidos os resultados das análises do Antibiograma em Meio Sólido, as dezenove bactérias selecionadas foram cultivadas em meio de cultura caldo Lúria Bentani – (LB) à temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

Após o crescimento prévio das culturas, foram inoculados em microtubos 10 μL de pré-inóculo (10⁸ UFC.mL⁻¹) com 1 mL de caldo LB acrescido de 1% do emulsificante dimetilsulfóxido (DMSO) e contendo diferentes concentrações do óleo essencial (MALOZ, 2005). Posteriormente ao processo de inoculação,

os microtubos foram incubados sob agitação eletromagnética (60 Hz), por um período de 24 horas à temperatura de 32 °C.

Antes e após o período de incubação, 0 e 24 horas, respectivamente, foram transferidas alíquotas e 100 µL da cultura bacteriana para microplacas de fundo chato, realizando-se três repetições de leitura para cada concentração do óleo estudado. Com o objetivo de avaliar o crescimento bacteriano (densidade ótica) para determinar a CIM do óleo essencial sobre determinada bactéria, submeteu-se a leitura da microplaca através do leitor automático de microplacas (Marca Bio-Tec Instruments Inc, modelo EL800), acoplado em computador com programa Kcjunior, com comprimento de onda pré-selecionado de 490 nm. As concentrações de óleo essencial testadas no experimento para o óleo e os dezenove microrganismos selecionados foram de 2; 1; 0,5; 0,375; 0,25; 0,175; 0,1; 0,0875; 0,075; 0,0625; 0,05; 0,025; 0,01; 0,005; 0,002; e 0%, sendo que estas correspondem à 20,0; 10,0; 5,0; 3,75; 2,50; 1,75; 1,0; 0,875; 0,750; 0,625; 0,500; 0,250; 0,100; 0,050; 0,020; e 0 mg.mL⁻¹, respectivamente. A inibição do crescimento foi determinada pela diferença entre as leituras realizadas em 24 horas pela leitura realizada no tempo inicial. Os valores médios de densidade ótica foram analisados estatisticamente por análise de variância seguida de teste de Tukey (p < 0,05) para determinar a CIM.

2.3 Atividade antioxidante do óleo essencial

A metodologia consiste na medida da extinção da absorção do radical 1,1-difenil-2-picril hidrazil (DPPH) em 515 nm (MIRANDA; FRAGA, 2006). A determinação da atividade antioxidante foi realizada em triplicata, por método espectrofotométrico. A técnica consistiu na incubação por 10 minutos, de 500 µL de uma solução etanólica de DPPH 0,1 mM com 500 µL de soluções contendo concentrações crescentes de óleo essencial do Ho-Sho (500; 1000; 2500; 5000; 10000; 15000; 20000; 25000; 30000; 35000; 40000; 45000; 50000 µg.mL⁻¹) em etanol. Procedeu-se da mesma forma para a preparação da solução denominada “controle”, porém substituindo-se 500 µL da amostra em 500 µL de solvente etanol. O percentual de captação do radical DPPH foi calculado em termos da porcentagem de atividade antioxidante (AA%) (Equação 1).

$$AA\% = \frac{100 - \left\{ \left[(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100 \right] \right\}}{Abs_{controle}} \quad (1)$$

A determinação foi feita em espectrofotômetro UV-Visível marca Agilent Technologies, modelo 8453E. Para verificação de interferentes da metodologia empregada, diluiu-se o óleo essencial do Ho-Sho em etanol, na mesma faixa de concentração em estudo (500; 1000; 2500; 5000; 10000; 15000; 20000; 25000; 30000; 35000; 40000; 45000; 50000 µg.mL⁻¹). Analisaram-se as amostras em espectrofotômetro em comprimento de onda de 515 nm, com o objetivo de avaliar a absorvância das diferentes concentrações das amostras. Após a avaliação da faixa de concentração ideal, calculou-se a concentração de óleo essencial necessária para capturar 50% do radical livre DPPH (IC₅₀) por análise de regressão linear (CARBONARI, 2005).

3 Resultados e discussão

3.1 Caracterização química do óleo essencial

A Figura 1 apresenta o cromatograma do óleo essencial de Ho-Sho. A partir do cromatograma, foi construída a Tabela 1 que apresenta os constituintes do óleo essencial de Ho-Sho (*Cinnamomum camphora*), onde pode-se observar o linalol (91,98%) como componente majoritário. Esses resultados corroboram com os de Yoshida et al. (1969), Lin e Hua (1987), Tao et al. (1987) e Frizzo et al. (2000), que apontam este composto como o principal componente do óleo essencial de Ho-Sho, em concentrações que variaram de 66 a 91%.

3.2 Atividade antimicrobiana do óleo essencial

Difusão em placas

Após a realização dos testes de atividade antimicrobiana do óleo essencial do Ho-Sho (*Cinnamomum camphora*), observou-se que a maior atividade antimicrobiana, dentre as dezenove bactérias testadas, foi observada sobre a *Xanthomonas campestris* (33,0 mm), seguida de *Escherichia coli* (27,5 mm) e *Proteus vulgaris* (26,5 mm). A menor atividade foi constatada sobre a bactéria *Yersinia enterocolitica* com a formação de halo de 10,5 mm (Tabela 2). Após o tratamento estatístico dos dados obtidos, foram observadas diferenças significativas (p < 0,05) entre os halos de inibição das diferentes bactérias em cada grupo. Comparando-se a média geral das Gram-positivas em relação a das Gram-negativas, os resultados demonstraram não existir diferença significativa (p < 0,05). Diversos autores reportaram

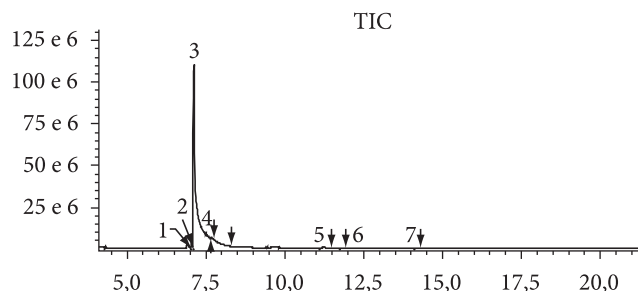


Figura 1. Cromatograma do óleo essencial do Ho-Sho analisado por cromatografia gasosa com detector de massas.

Tabela 1. Lista dos compostos obtidos a partir da análise cromatográfica do óleo essencial de Ho-Sho (*Cinnamomum camphora*).

Picos	Nome do composto	Tempo de retenção (minuto)	Área (%)
1	Óxido de linalol (cis)	6,846	1,36
2	Óxido de linalol (trans)	7,010	1,51
3	Linalol	7,201	91,98
4	Cânfora	7,660	1,11
5	β- cariofileno	11,092	1,43
6	α- humuleno	11,666	0,50
7	Óxido de cariofileno	13,904	2,11

uma menor eficiência dos óleos essenciais sobre bactérias Gram-negativas, atribuindo-a, em parte, à maior complexidade da dupla parede celular destes microrganismos em contraste com a estrutura simples da parede celular de bactérias Gram-positivas (JANSSEN et al., 1987; SHAPIRO et al., 1994; HELANDER et al., 1998; HAMMER; CARSON; RILEY, 1999; VELICKOVIC et al., 2002; KALEMBA; KUNICKA, 2003; BAGAMBOULA et al., 2004; TEPE et al., 2004). Entretanto, esta diferença não foi observada neste trabalho.

Tabela 2. Atividade antimicrobiana pelo método de difusão de placas do óleo essencial do Ho-Sho (*Cinnamomum camphora*) sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Bactérias Gram positivas	Clorafenicol (mm)	Halo de inibição médio (mm)•
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433)	29	20 ^{cd}
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC10240)	27	22,0 ^{bc}
<i>Sarcina</i> sp. (*)	28	14,5 ^{de}
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	26	23,0 ^{bc}
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	32	17,0 ^{de}
<i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 5175)	27	13,0 ^{de}
Média	28,1	18,25 ^f
Bactérias Gram negativas	Clorafenicol (mm)	Halo de inibição médio (mm)•
<i>Acinetobacter</i> sp. (*)	31	22,0 ^{bc}
<i>Aeromonas</i> sp. (*)	22	11,0 ^e
<i>Citrobacter freundii</i> (ATCC 8090)	17	12,0 ^e
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	14	27,5 ^{ab}
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)	17	12,5 ^e
<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 25933)	38	26,0 ^{bc}
<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC 13315)	26	26,5 ^{bc}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	17	N.S. ^f
<i>Salmonella choleraesuis</i> (ATCC 10708)	35	15,0 ^{de}
<i>Serratia marcescens</i> (ATCC 13880)	27	20,0 ^{cd}
<i>Shigella flexneri</i> (ATCC 12022)	30	20,0 ^{cd}
<i>Xanthomonas campestris</i> (*)	33	33,0 ^a
<i>Yersinia enterocolitica</i> (ATCC 10460)	19	10,5 ^e
Média	25	19,6 ^f

N. S. = Não sensível; *microrganismos obtidos a partir do Instituto Biológico, Campinas - SP; ATCC: American Type Culture Collection, USA; # não houve diferença significativa entre os halos de inibição pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); e • médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

De todas as bactérias testadas, apenas a *Pseudomonas aeruginosa* não apresentou halo de inibição. Estudos de atividade antimicrobiana realizados com extratos etanólicos de malva, camomila e capim-limão não apresentaram nenhuma inibição contra bactérias, inclusive sobre a *Pseudomonas aeruginosa* (ASSOLINI; TEDESCO; CARPES, 2006). A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia alba* (erva cidreira) de toda a planta sobre bactérias de interesse clínico foram avaliadas por Alea (1997). O óleo essencial apresentou atividade antibacteriana principalmente sobre bactérias Gram-positivas, porém, em conformidade com este estudo, a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* mostrou-se resistente às diferentes concentrações testadas. Sivropoulou et al. (1996) testaram três óleos essenciais do gênero *Origanum*, os quais também não apresentaram atividade antimicrobiana sobre esta bactéria.

De uma forma geral, pôde-se observar que a atividade antioxidante foi relativamente baixa quando da utilização do teste DPPH. Apesar dos resultados de baixa atividade antioxidante, o linalol, principal componente do óleo essencial de Ho-Sho, pode vir a ser empregado como um intermediário na síntese de vitamina E, a qual possui elevada atividade antioxidante.

Concentração inibitória mínima

A Tabela 3 apresenta as Concentrações Inibitórias Mínimas para as bactérias avaliadas. Os valores referentes às bactérias Gram-positivas variaram de 1,00 mg.mL⁻¹ (*Streptococcus mutans*) a 1,75 mg.mL⁻¹ (*Staphylococcus epidermidis*). A variação das CIM para as bactérias Gram-negativas foi de 0,625 mg.mL⁻¹ (*Citrobacter freundii*) a 2,50 mg.mL⁻¹ (*Shigella flexneri*).

Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de Ho-Sho (*Cinnamomum camphora*) em função das bactérias avaliadas.

Bactérias Gram-positivas	CIM (mg.mL ⁻¹)
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,75
<i>Micrococcus luteus</i>	1,75
<i>Sarcina</i> sp.	1,75
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,75
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,75
<i>Streptococcus mutans</i>	1,00
Bactérias Gram-negativas	CIM (mg.mL ⁻¹)
<i>Acinetobacter</i> sp.	1,75
<i>Aeromonas</i> sp.	1,75
<i>Citrobacter frendii</i>	0,625
<i>Escherichia coli</i>	1,75
<i>Klebsiella peneumoniae</i>	1,75
<i>Proteus mirabilis</i>	1,75
<i>Proteus vulgaris</i>	1,75
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,875
<i>Salmonella choleraesuis</i>	1,00
<i>Serratia marcescens</i>	1,75
<i>Shigella flexneri</i>	2,50
<i>Xanthomonas campestris</i>	1,75
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0,875

As Figuras 2 e 3 apresentam gráficos representativos da CIM para duas diferentes bactérias testadas neste trabalho.

Para Nascimento et al. (2007), os métodos de atividade antimicrobiana (diluição e difusão) não são necessariamente comparáveis. Isto porque o método de diluição mostra ser o que melhor disponibiliza dados quantitativos, enquanto a difusão em placa de Petri se constitui em um método qualitativo. Os resultados obtidos por cada um desses métodos podem diferir devido a fatores intrínsecos aos testes.

Cumprido salientar que existem fatores que podem interferir nos valores da CIM obtidos através de métodos de difusão e diluição: condições de cultivo (tempo de incubação, temperatura, taxa de oxigênio), meio de cultura, concentração das substâncias testadas dispersão e emulsificação dos agentes utilizados na emulsão óleo-água (RIOS; RECIO, 2005).

A metodologia empregada não permitiu visualizar o efeito da concentração do óleo sobre *Pseudomonas aeruginosa*, pois não se observou uma relação direta entre a concentração do óleo essencial e a densidade ótica (absorbância) (Figura 4). Isto pode ter ocorrido pelo fato de que esta bactéria produz um grande número de cápsulas celulares, alterando a viscosidade do meio e, em consequência, a absorbância. Assim, buscou-se testar diferentes tempos de crescimento visando a redução da produção capsular.

Com crescimento de 16 horas, observou-se uma relação direta entre a concentração de óleo essencial e a densidade ótica, podendo-se determinar a CIM. Neste tempo de incubação, provavelmente não houve aumento na viscosidade do meio suficiente para interferir na análise.

Hammer, Carson e Riley (1999), ao avaliarem óleos essenciais de *Salvia officinalis*, obtiveram valores de CIM superiores aos encontrados neste trabalho, sendo para *Enterococcus faecalis* 20 mg.mL⁻¹, para *Escherichia coli* 5 mg.mL⁻¹ e para *Klebsiella pneumoniae* 20 mg.mL⁻¹.

Quando avaliados óleos essenciais do tomilho (*Thymus vulgaris*) e menta (*Mentha piperita*), observa-se que os espectros de ação do óleo essencial do Ho-Sho avaliados neste estudo se mostraram inferiores, sendo que, para inibir o crescimento dos microrganismos *E. coli*, *Salmonella* e *S. aureus*, foram necessárias 0,5; 0,4 e 0,2 mg.mL⁻¹ do óleo de tomilho. Para inibir os mesmos microrganismos, foi necessário mais de 1 mg.mL⁻¹ do óleo de menta para os dois primeiros e 0,4 mg.mL⁻¹ para *S. aureus* (VELICKOVIC et al., 2002).

3.3 Atividade antioxidante do óleo essencial

No teste de DPPH, a habilidade do óleo essencial agir como doador de átomos de hidrogênio ou elétrons na transformação de DPPH na forma reduzida de DPPH - H (difenilpicrilhidrazina) é medida espectrofotometricamente. O DPPH é um radical livre, estável em temperatura ambiente, que produz uma solução violeta em etanol. Na presença de componentes antioxidantes, o DPPH é reduzido, produzindo uma solução etanólica transparente.

Os resultados obtidos após a determinação da atividade antioxidante do óleo essencial em diferentes concentrações estão representados na Tabela 4. Os resultados demonstram

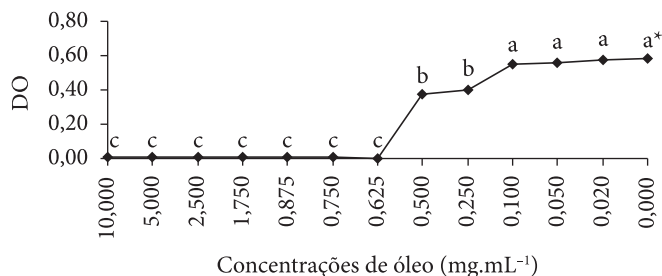


Figura 2. Gráfico representativo da concentração inibitória mínima do óleo essencial do Ho-Sho sobre a bactéria Gram-negativa *Citrobacter freundii*; DO = densidade ótica – absorbância a 515 nm.

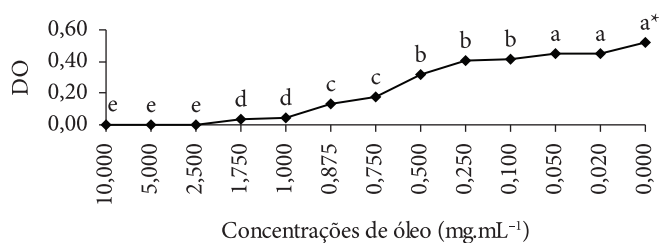


Figura 3. Gráfico representativo da concentração inibitória mínima do óleo essencial do Ho-Sho sobre a bactéria Gram-negativa *Shigella flexneri*; DO = densidade ótica – absorbância a 515 nm.

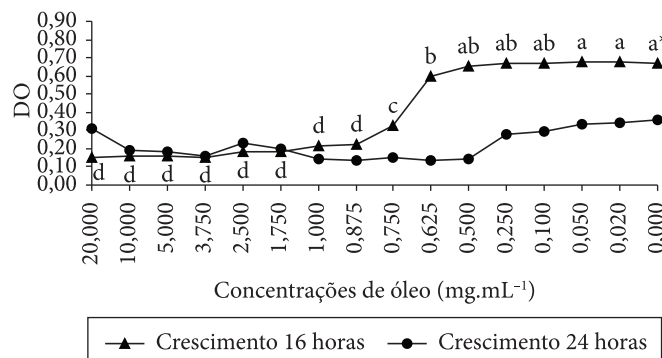


Figura 4. Gráfico representativo da concentração inibitória mínima do óleo essencial do Ho-Sho sobre a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*; DO = densidade ótica – absorbância a 515 nm.

Tabela 4. Porcentagem da neutralização do DPPH do óleo essencial de Ho-Sho (*Cinnamomum camphora*).

Concentrações (µg.mL ⁻¹)	(AA%)
500	7,11
1000	15,43
2500	22,62
5000	31,08
10000	55,13
15000	61,27
20000	73,10
25000	80,14
30000	83,97
35000	85,69

Tabela 5. Espécies utilizadas para atividade antioxidante com o teste de DPPH.

Espécie		IC ₅₀ µg.mL ⁻¹	Autores
Nome popular	Nome científico		
Goiabeira	<i>Psidium guajava</i> L.	33,57	Vicentino e Menezes, (2007).
Pimentão	<i>Capsicum annum</i> L.	906,08	
Guaco	<i>Mikania glomerata</i> Spreng.	1283,88	
Orégano	<i>Origanum vulgare</i> L.	0,17	Bozin et al. (2006).
Tomilho	<i>Thymus vulgaris</i> L.	0,19	
Manjeriçã	<i>Ocimum basilicum</i> L.	0,39	Mimica-Dukic et al. (2004). Roesler et al. (2007).
Erva cidreira	<i>Melissa officinalis</i> L.	7,58	
Cagaita	<i>Eugenia dysenterica</i> DC.	14,15	
Pequi	<i>Caryocar brasiliense</i> Camb.	17,98	
Araticum	<i>Annona crassiflora</i> Mart.	49,18	

que o percentual antioxidante aumenta proporcionalmente a concentração de óleo adicionado, atingindo o valor máximo de 85,69% de atividade antioxidante para a concentração de 35000 µg.mL⁻¹.

A correlação entre a atividade antioxidante (%) e a concentração de óleo utilizado ($Y = 0,0021x + 22,82$) com $R^2 = 0,9145$ forneceu um IC₅₀ de 12942 µg.mL⁻¹, que é a concentração de óleo essencial necessária para atingir 50% de atividade antioxidante. Esta concentração pode ser considerada alta, se comparada com antioxidantes por excelência, como o ácido ascórbico (IC₅₀ = 2,15 µg.mL⁻¹) e o BHT (IC₅₀ = 5,37 µg.mL⁻¹).

Segundo Mensor et al. (2001), a planta *Ginkgo biloba* é uma das plantas consideradas com alta atividade antioxidante, pois possui um IC₅₀ de 38,91 µg.mL⁻¹. Isso demonstra que o óleo essencial de *C. camphora* apresenta uma baixa atividade antioxidante quando comparado com o extrato de *G. biloba*, cerca de 330 vezes menos.

A Tabela 5 apresenta alguns estudos sobre atividades antioxidantes com o teste do DPPH mostrando o IC₅₀ de algumas plantas de interesse.

Lee et al. (2005), em estudos de identificação de componentes voláteis e suas propriedades antioxidantes em manjeriçã (*Basilicum ocimum* L.) e folhas de tomilho (*Thymus vulgaris*), evidenciaram que o linalol é o componente majoritário encontrado no manjeriçã e o terceiro principal composto do tomilho. Doze compostos de manjeriçã e tomilho (dentre estes o linalol) foram avaliados em termos de atividade antioxidante. O eugenol, timol, carvacrol e o alilfenol foram os compostos que apresentaram maior atividade antioxidante.

4 Conclusões

Os dados obtidos com este trabalho permitem concluir que o óleo essencial de Ho-Sho (*Cinnamomum camphora*) apresentou ação antibacteriana sobre a maioria das bactérias testadas.

As concentrações inibitórias mínimas do óleo essencial de Ho-Sho são semelhantes às encontradas em outras espécies da família *Lauraceae*. Os resultados obtidos podem abrir

perspectivas no sentido de desenvolver um antimicrobiano eficaz, podendo ser usado no tratamento de doenças infecciosas causadas por microrganismos, principalmente *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, associados a infecções de pele.

Considerando-se o teste DPPH, verificou-se que o óleo essencial de Ho-Sho não demonstrou potencial para ser utilizado como antioxidante, uma vez que óleos essenciais de outras espécies têm demonstrado atividade superior ao óleo de *Cinnamomum camphora* para o mesmo teste.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao FAPERGS, SCT/RS e CNPq o apoio financeiro e suporte para o desenvolvimento deste trabalho.

Referências bibliográficas

- ADAM, D. Global antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1-5, 2002.
- ALEA, J. A. Composición y propiedades antibacteriana de aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Revista Cubana de Farmácia**, v. 30, n. 1, p. 29-35, 1997.
- ASSOLINI, F. C.; TEDESCO, A. M.; CARPES, S. T. Atividade antioxidante e antibacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. **Brasilian Journal of Food Technology**, v. 9, n. 3, p. 209-215, 2006.
- BOZIN, B. et al. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 5, p. 1822-1828, 2006.
- BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal plants**. 2 ed. London: Intercept, 1999.
- BUSHBAUER, G.; JIROVETZ, L. Aromatherapy-Use of Fragrances and essential oils as medicaments. **Flavour Fragrance Journal**, v. 9, n. 5, p. 217-222, 1994.
- CARBONARI, K. A. **Avaliação do Potencial Antioxidante (In vitro e In vivo) e Antiinflamatório de** *Ouratea parviflora*, *Polymnia sonchifolia* e *Marlierea obscura*. 2005. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

- ÁVARO, S. et al. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. **Food Chemistry**, v. 111, n. 3, p. 648-653, 2008.
- DEMIRCI, F. et al. Antibacterial activity of two *Phlomis* essential oils against food pathogens. **Food Control**, v. 19, n. 12, p. 1159-1164, 2008.
- DIPLOCK, A. T. et al. Functional food science and defence against reactive oxidative species. **British Journal of Nutrition**, v. 80, n. 1, p. 77-112, 1998.
- FRANCO, R. et al. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. **Cancer Letters**, v. 266, n. 1, p. 6-11, 2008.
- FRIZZO, C. D. et al. Essential Oils of Camphor Tree (*Cinnamomum camphora* Nees & Eberm) Cultivated in Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, n. 3, p. 313-316, 2000.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Clarendon Press: Oxford, 1989.
- HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 6, p. 985-990, 1999.
- LEE, S. J. et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 131-137, 2005.
- LETIZIA, C. S. et al. Fragrance material review on linalool. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 7, p. 943-964, 2003.
- LIN, Z.; HUA, Y. Chemical constituents of 14 essential oils from Lauraceae growing in Yibin area, Sichuan Province. **Linchan Huaxue Yu Gongye**, v. 7, p. 46-64, 1987.
- LIS-BAUCHIN, M.; DEANS, S. G. Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 82, n. 6, p. 759-762, 1997.
- MALOZ, M. K. P. **Caracterização morfológica, avaliação agrônômica, química e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de diferentes espécies exóticas de gênero Salvia**. 2005. 87 f. Tese (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2005.
- MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 53, n. 2, p. 127-130, 2001.
- MIMICA-DUKIC, N. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of three mentha species essential oils. **Plant Medicinals**, v. 69, n. 5, p. 413-419, 2003.
- MIMICA-DUKIC, N. et al. Antimicrobial and antioxidant of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 9, p. 2485-2489, 2004.
- MIRANDA, A. L. P.; FRAGA, C. A. M. Atividade Seqüestradora de Radical Livre Determinação do Potencial Antioxidante de Substâncias Bioativas. In: MONGE A.; GANELLIN, C. R. (Ed.). **Practical Studies for Medicinal Chemistry**. Geneva: IUPAC, 2006.
- NASCIMENTO, P. F. C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.
- REDDY, M. V. B. et al. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. **Phytochemistry**, v. 47, n. 8, p. 1515-1520, 1998.
- RELIENE, R.; SCHIESTL, R. F. Environmental Toxins, Nutrition, and Cancer. In: HEBER, D. et al. **Nutritional Oncology**. Burlington: Elsevier, 2006. p. 273-282.
- ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.
- RUBERTO, G.; BARATTA, M. T. Antioxidant activity of selected essential oils components in two lipid model systems. **Food Chemistry**, v. 69, n. 2, p. 167-174, 2000.
- SERAFINI, L. A. et al. **Extrações e aplicações de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002.
- SMITH, M. A.; PERRY, G.; PRYOR, W. A. Causes and consequences of oxidative stress in Alzheimer's disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 11, p. 1049-1052, 2002.
- TSIGARIDA, E.; SKANDAMIS, P.; NYCHAS, G. F. E. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence oregano essential oil at 5 °C. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 6, p. 901-909, 2000.
- VELICKOVIC, D. T. et al. Chemical composition and antimicrobial action of the ethanol extracts of *S. pratensis* L. *S. glutinosa* L. *S. aethiopsis* L. **Journal Serbia Chemical Society**, v. 67, n. 10, p. 639-646, 2002.
- VICENTINO, A. R. R.; MENEZES, F. S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia de DPPH. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 384-387, 2007.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Food safety and food borne illness. In: **World health Organization Fact sheet**. Geneva: World Health Organization, 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>>. Acesso em: jan. 2007.
- YOSHIDA, T. et al. Minor Constituents of Japanese Ho-Leaf Oil. **Agriculture Biological Chemistry**, v. 33, n. 3, p. 343-352, 1969.