

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO DE ORÉGANO LIVRE E EM NANOEMULSÕES¹

EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF FREE OREGANO OIL IN NANOEMULSIONS

Aline Abati Bolzan², Leonardo Quintana Lopes², Laíne Salin Marin³, Roberto Christ Viana Santos⁴, Renata Raffin⁴, Solange Binotto Fagan⁴ e Luis Otavio Sousa Bulhões⁵

RESUMO

Nos últimos anos, observou-se um crescimento do chamado mercado verde, principalmente nas áreas de alimentação e cosméticos. Isso se deve à exigência cada vez maior dos consumidores no que se refere à origem das matérias-primas. A adição de produtos naturais e a substituição de aditivos químicos por alternativas provenientes da natureza têm recebido preferência. Nesse contexto, estão os óleos essenciais, que, devidos às suas características antimicrobianas amplamente documentadas, apresentam-se como uma alternativa natural na conservação de alimentos e cosméticos. Neste trabalho, foi avaliado o potencial antimicrobiano do óleo essencial de orégano. Foram avaliados o valor do número de equilíbrio hidrófilo lipófilo (EHL), a termogravimetria e a ação antimicrobiana. O estudo mostra que o óleo de orégano livre e óleo de orégano nanoemulsionado têm atividade efetiva contra *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Streptococcus sp*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina e *Salmonella enteritidis*. Para a *Pseudomona aeruginosa*, a atividade biocida é menor e não há inibição com as nanoemulsões.

Palavras-chave: dispersão óleo em água, óleo essencial, biocida, *origanum vulgare*.

ABSTRACT

*In recent years, there has been a growth of the so-called green market, particularly in the areas of food and cosmetics. This is due to the increasing consumer demand concerning the origin of the raw materials. The addition of natural products and to replace chemical additives for alternatives from nature has been preferred. In this context, the essential oils emerge in this context due to their antimicrobial characteristics widely documented. They are presented as natural alternatives for the preservation of foods and cosmetics. The paper evaluates the antimicrobial potential of the essential oil of oregano. The value of the hydrophilic lipophilic balance number (HLB), the thermogravimetry and the antimicrobial action are evaluated. The study shows that the free oregano oil and the nanoemulsions oregano oil have effective activity against *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Streptococcus sp*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant and *Salmonella enteritidis*. For *Pseudomonas aeruginosa*, the biocide activity is lower and there is no inhibition with the nanoemulsions.*

Keywords: oil in water dispersion, essential oil, biocide, *origanum vulgare*.

¹ Trabalho realizado no Programa de Pós-graduação em Nanociências.

² Alunos de doutorado do Programa de Pós-graduação em Nanociências - Centro Universitário Franciscano.

³ Acadêmica do Curso de Biomedicina - Centro Universitário Franciscano.

⁴ Colaborador. Docente do Programa de Pós-graduação em Nanociências - Centro Universitário Franciscano.

⁵ Orientador. Docente do Programa de Pós-graduação em Nanociências - Centro Universitário Franciscano.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, observou-se um crescimento do chamado mercado verde, alicerçado na busca cada vez maior de melhor qualidade de vida, o que vem transformando os consumidores em clientes mais seletivos e críticos em suas escolhas. Essa tendência pode ser observada em diversos ramos, como na escolha de alimentos, em que os consumidores tendem a optar por aqueles isentos de aditivos químicos ou com a substituição destes por alternativas provenientes da natureza. O mesmo observa-se no ramo de cosméticos. Os consumidores estão cada vez mais atentos a questões como origem das matérias-primas e substituição dos cosméticos de base sintética por matérias-primas naturais renováveis. Outro fator importante que faz com que a opção por produtos naturais seja crescente é a existência de estudos científicos que comprovam a segurança e eficácia. Esses aspectos contribuem para a substituição do uso de óleos de ácidos graxos de origem animal por aqueles de origem vegetal; rejeição aos testes de produtos em animais; o de embalagens recicláveis e tecnologias socialmente e ambientalmente corretas (CALIARI, 2002).

Nesse contexto, os óleos essenciais têm sido cada vez mais utilizados como conservantes de alimentos, fármacos e cosméticos, devidos a suas características antimicrobianas amplamente documentadas contra fungos e bactérias, tais como *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomona aeruginosa* e suas variantes resistentes (RAO et al., 2010). Além disso, os óleos atuam no sensorial dos alimentos e proporcionam um sabor diferenciado e natural, além de um aroma agradável e exótico em formulações cosméticas e, em alguns casos, melhoram as propriedades dermato-cosméticas.

Em geral, a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais tem sido explicada pela presença do C10 e C15 di-terpenoides com anel aromático e grupos fenólicos hidrofílicos capazes de formar pontes de hidrogênio com sítios ativos de enzimas (PICONE et al., 2013). Embora as propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais e seus componentes majoritários não sejam algo novo, seus mecanismos de ação ainda não são completamente conhecidos. A utilização dos óleos essenciais em formulações encontra alguns obstáculos, como a baixa estabilidade e a alta volatilidade desses compostos, o que se torna crítico durante o período de armazenagem e transporte. A dificuldade de incorporação em formulações aquosas também é um desafio por se tratarem de substâncias hidrofóbicas. A nanotecnologia tem sido utilizada para contornar tais dificuldades. Devido ao seu tamanho nanométrico, os sistemas dessas substâncias podem interagir de modo mais eficiente com a matriz a ser conservada, o que possibilita, inclusive, o controle da liberação dos compostos ativos do óleo essencial. Para esse propósito, podem ser empregados lipossomas e nanoemulsões (MORAES et al., 2013).

O óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) tem como constituinte majoritário o carvacrol (71%), Gama-terpineno (4,5%), Beta-Cariofileno (4%), Para-cimeno (3,5%) e timol (3%). A nanoemulsão de carvacrol tem se demonstrado efetiva contra patógenos de origem alimentar tanto *in vitro* quanto *in vivo* (LANDRY et al., 2014).

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo avaliar as características termoquímicas do óleo de orégano e avaliar a estabilidade e a atividade biocida de nanoemulsões do tipo óleo em água preparadas com esse óleo.

MATERIAL E MÉTODOS

O óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) 84012-24-8 (CAS) foi adquirido na empresa Ferquima Ind. e Com. Ltda. (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brazil), e seus parâmetros de qualidade (aparência: líquido límpido, cor: marrom, densidade -20°C: 0,954 g cm⁻³, índice de refração -20°C: 1,511) foram descritos em laudo técnico. O óleo foi extraído pelo processo de destilação a vapor das folhas. O componente majoritário do óleo é o carvacrol com 71% m/m.

ANÁLISE TÉRMICA DO ÓLEO DE ORÉGANO (TERMOGRAVIMETRIA (TG))

A análise termogravimétrica (TGA) é uma técnica que avalia a variação de massa de uma amostra em relação à temperatura ou tempo, em condições de atmosfera controlada. O experimento consiste, basicamente, em depositar a amostra, neste experimento o óleo essencial de orégano, em uma cápsula suspensa por um fio metálico de platina conectado a uma balança. O conjunto é inserido de forma automática em um forno. A variação de massa da amostra é determinada pela diferença entre a massa do cadinho de referência e a massa do cadinho com a amostra a analisar conforme a temperatura aumenta (WENDLANDT, 1986).

Esse equipamento fornece informação não só acerca da variação de massa, mas também é utilizado para análise quantitativa, em que os declives observados pelos dados fornecidos pelo equipamento permitem determinar a quantidade de um ou mais compostos presentes na amostra. Pela análise dos declives das várias regiões do termograma, é possível determinar a quantidade de um ou mais compostos presentes na amostra.

A análise térmica foi realizada no aparelho TGA Q5000 marca TA Instruments, com 3,4240 mg do óleo de orégano com fluxo de ar sintético e com a temperatura variando em torno de 20°C/min.

PREPARO DAS NANOEMULSÕES

As nanoemulsões (NE) foram preparadas pelo processo de emulsificação por inversão de fases, considerado de baixa energia (FERNANDEZ et al., 2014). As NE do tipo óleo em água foram obtidas variando a proporção de tensoativos e mantendo a quantidade de óleo de orégano constante em 5% m/m. A mistura de tensoativos foi composta por polissorbato 80 (Tween 80, EHL=15, Fluka) e monooleato de sorbitano 80 (Span 60, EHL=4,3, Oxiteno) diluída em óleo. As duas fases

(aquosa e oleosa) foram pesadas separadamente e mantidas em agitação magnética a 60°C por 25 minutos. Em seguida, a água foi vertida na fase oleosa com um fluxo controlado sob agitação com o Ultra-Turrax modelo T25 a 10 000 rpm; concluída a transferência para a completa homogeneização, a velocidade de rotação foi alterada para 15 000 rpm e aplicada durante 5 minutos.

As composições das NE preparadas neste trabalho estão descritas na tabela 1. Para o cálculo do número do equilíbrio hidrofílico lipofílico (EHL) requerido utilizando o par de tensoativos a uma concentração de 5%, utilizou-se a equação:

$$EHL_R = EHL_A \times 0,01.A + EHL_B \times 0,01.B$$

sendo $A + B = 100\%$; A a porcentagem de tensoativo hidrofílico; B a porcentagem de tensoativo lipofílico; EHL_R o número do Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico Resultante; EHL_A o número do Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico de A; e EHL_B o número do Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico de B.

Tabela 1 - Composição das nanoemulsões contendo o óleo de orégano.

EHL	Óleo de orégano % m/m	Span 80 % m/m	Tween 80 % m/m	H ₂ O % m/m
7,0	5	3,74	1,26	89,80
10,0	5	2,30	2,70	89,80

DETERMINAÇÃO DO VALOR DO pH

Para determinar o valor do pH, foi utilizado o potenciômetro marca Digimed modelo DM 21. A avaliação dessa característica foi realizada em diluições do produto (1:10). O valor do pH foi determinado em triplicata.

DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO MÉDIO

As determinações do diâmetro médio foram realizadas por meio de espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer® Nanoseries). As suspensões foram diluídas 500 vezes em água Milli-Q®, e os resultados foram determinados pela média de três repetições.

ENSAIO MICROBIOLÓGICO

Os testes microbiológicos foram realizados conforme descrito por Bauer (1966), dispensando os discos de papel-filtro, impregnados com as amostras em concentrações fixas, sobre a placa de ágar (Mueller Hilton), após a sementeira do inóculo microbiano com aproximadamente

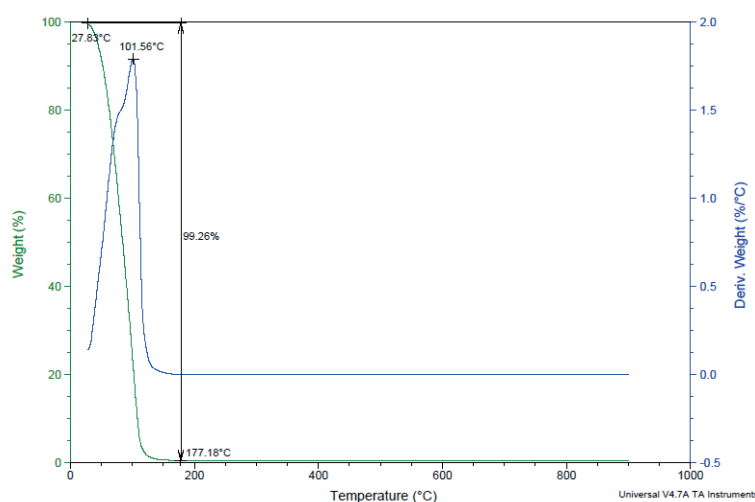
1 a 2×10^8 UFC/mL (CLSI, 2008). As placas foram incubadas por 24 horas em estufa antes da avaliação do resultado obtido. Após a incubação, as amostras nas quais ocorreu a inibição do crescimento do microrganismo tiveram o halo de inibição medido com paquímetro. Os microrganismos utilizados foram *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Streptococcus sp*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente à metilina, *Salmonella enteritides*, *Pseudomonas aeruginosa*. Foram adicionados 10 μ L do óleo puro ou da NE contendo 5% em massa do óleo em cada disco.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ANÁLISE TÉRMICA DO ÓLEO

A análise térmica foi realizada para avaliar se, na temperatura de processamento para o preparo das nanoemulsões, entre 60 a 80°C, ocorre perda de massa. Os resultados, apresentados na figura 1, mostram que a primeira variação de massa de 20% ocorre em 75°C. Na temperatura de 75°C, são liberados os compostos mais voláteis. O carvacrol, principal componente biocida, tem ponto normal de ebulição maior que 100°C. A maior variação de massa ocorre a 100°C, e a queima total (sem resíduos) ocorre a 177°C. A derivada da variação de massa tem seu máximo em 101,56°C, o que representa 50% da variação de massa. O óleo de orégano é termicamente estável na temperatura de processamento para a obtenção de nanoemulsões na faixa de 60 a 75°C.

Figura 1 - Análise térmica do óleo de orégano obtida a 20°C/min em atmosfera com ar.



DIÂMETRO MÉDIO

A NE 1 de EHL na ordem de 7,0 apresentou um diâmetro médio de 170 nm, sendo mais estável. A NE 2 de EHL na ordem de 10,0 apresentou um diâmetro médio de 240 nm, sendo menos

estável, separando o óleo da emulsão em alguns minutos. A NE mais estável, com EHL 7,0 permaneceu com o mesmo diâmetro após 90 dias, mantida sob temperatura ambiente.

DETERMINAÇÃO DO VALOR DO pH

O valor do pH das nanoemulsões recém preparadas está apresentado na tabela 2. Os valores ficam próximos ao pH da água, indicando que há estabilidade da dispersão. O pH de 5% m/m do óleo disperso em água é cerca de 4,6 devido à presença de ácidos graxos no óleo. Após 90 dias, o pH da NE1 foi $6,5 \pm 0,3$ e para a NE2 foi $5,1 \pm 0,6$.

Tabela 2 - pH das nanoemulsões de óleo de orégano.

	Medida de pH das Nanoemulsões (NE)			pH médio
NE 1	6,75	6,77	6,83	6,78
NE 2	6,86	6,88	6,91	6,88

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

A análise microbiológica está apresentada na tabela 3 com os resultados dos halos de inibição promovidos pelo óleo livre e nanoemulsões. A NE 2 mostrou-se mais efetiva contra os microrganismos testados e, por apresentar um encapsulamento menos estável, liberou o óleo mais rapidamente, o que resultou na atividade antimicrobiana. A NE 1 com o EHL próximo de 7,0 apresentou um melhor encapsulamento e uma liberação mais lenta do óleo. Como o teste tem duração de 24 horas, a NE mais estável levaria mais tempo para liberar o óleo e resultar em atividade antimicrobiana. A atividade antimicrobiana nas nanoemulsões é cerca de 50% menor para o óleo nanoemulsionado após 24 horas de contato com os micro-organismos. Essa resposta pode ser associada a um menor coeficiente de difusão do óleo nanoemulsionado ou devido à perda de cerca de 20% de massa dos componentes do óleo na temperatura de 60°C.

A hidrofobicidade dos óleos essenciais é um dos fatores que pode inibir o crescimento microbiano. O óleo interage com a bicamada lipídica celular, o que afeta o transporte eletrônico e a produção de energia celular (NICOLSON et al., 1999). Essa interação aumenta a permeabilidade da membrana e, em decorrência disso, ocorre o extravasamento do conteúdo intracelular e a consequente morte do microrganismo (BURT, 2004; JUVEN et al., 1994).

O óleo puro apresentou maiores halos de inibição quando comparado com as nanoemulsões a 5% m/m. Embora o óleo puro apresente melhores resultados, ele é susceptível à oxidação, degradação térmica e fotodegradação. A presença de compostos voláteis e insolúveis em água compromete a utilização do óleo puro em formulações farmacêuticas. A alternativa viável para resolver esses problemas é a formação de nanoemulsões com o óleo de orégano. Os resultados aqui apresentados

são preliminares, porém mostram que, em baixas concentrações, as nanopartículas apresentam um importante efeito antimicrobiano.

Tabela 3 - Halo de Inibição em disco de difusão de Bauer (1966).

Microrganismo	Halo de Inibição em mm Disco difusão Bauer, 1966		
	NE 1	NE2	O
<i>E. coli</i>	10,2±1,0	18,5±1,0	28,7±1,8
<i>Streptococcus sp</i>	15,0±2,8	26,2±10,9	24,0±0,7
<i>Staphylococcus aureus</i>	14,0±5,6	22,5±3,5	29,0±0,0
SARM	13,0±1,4	22,0±0,7	28,5±0,7
<i>Salmonella enteritidis</i>	17,5±0,7	23,7±1,1	35±0,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,0	0,0	9,25 ± 0,3

SARM - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina;

NE1 - Nanoemulsão 1; NE2 - Nanoemulsão 2; O - Óleo de Orégano Livre.

CONCLUSÃO

O estudo mostrou que o óleo de orégano livre e o óleo de orégano nanoemulsionado têm atividade efetiva contra *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Streptococcus sp*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e *Salmonella enteritidis*. Para a *Pseudomonas aeruginosa*, a atividade biocida é menor e não há inibição com as nanoemulsões. O halo de inibição é maior para o óleo livre, decrescendo em cerca de 50% para as nanoemulsões.

Esse resultado é fruto de um primeiro trabalho na literatura que avalia a resposta de nanoemulsões com o óleo de orégano na inibição de microbiológica contendo diferentes micro-organismos. Os resultados obtidos são úteis para a pesquisa de novos conservantes naturais.

REFERÊNCIAS

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BURT S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential application in foods-a review. **International Journal Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

CALIARI, C. **Atributos e fatores na decisão de compra de Fitoderivados da Amazônia na Indústria de Higiene Pessoal e Cosméticos no BRASIL**. 2002. 110f. Dissertação (Mestrado em Agronegócios) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

CLSI. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, ninth ed. Approved standard M7-A6**. Wayne (PA), Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

FERNANDEZ, P. et al. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 251, p. 53-58, 2004.

JUVEN B. J.; KANNER J.; SCHVED F.; WEISSLOWICZ, H. Factors that interact with antimicrobial action of thyme essential oils and its active constituents. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 76, p. 626-631, 1994.

LANDRY, K. S. et al.. Effectiveness of a novel spontaneous carvacrol nanoemulsion against *Salmonella enterica enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 on contaminated mung bean and alfafa seeds. **International Journal Food Microbiology**, v. 187, p. 15-21, 2014.

MORAES, M. et al. Nanoemulsions encapsulating oregano (*Origanum vulgare*) essential oil: production by a low energy method and evaluation of antibacterial action. In: IFT13 - Annual Meeting and Food Expo, 2013. Chicago: Program & Exhibit Director, 2013, v. 1, p. 72.

NICOLSON, K.; EVANS, G.; O'TOOL, P. W. Potentiation of methicillin activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by diterpens. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, p. 233-239, 1999.

PICONE, G. et al. Evaluation of the effect of carvocrol on the *Escherichia coli* 555 metabolome by using 1H-NMR spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 141, p. 4367-4374, 2013.

RAO, A. et al. Mechanism of Antifungal Activity of Terpenoid Phenols Resembles Calcium Stress and Inhibition of the TOR Pathway. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5062-5069, 2010.

WENDLANDT, W. W. **Thermal analysis**. 3rd. ed. New York: Wiley-Interscience, 1986, v. 19, cap. 2, p.18-25.