

## Extração e aplicação do óleo essencial de orégano

## Extraction and application of oregano essential oil

Cibele Andreioli de Matos<sup>1</sup>, Viviane da Silva Lobo<sup>2</sup>

### RESUMO

O óleo de orégano destaca-se nas propriedades antimicrobianas e antioxidantes, atuando como conservantes naturais inibindo o crescimento de micro-organismos. Objetivou-se avaliar sua atividade antibacteriana frente às cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *C. albicans* e *P. aeruginosa* nos tempos de extração do óleo de 1h, 1:30 e 2h. O método para extração foi hidrodestilação utilizando Clevenger. Determinou-se a média de rendimento, volume e peso, sendo a extração de 2h com melhores resultados. Além disso, fez-se média de umidade e densidade, possuindo valores relativos de todos os tempos de extração. A atividade antimicrobiana do óleo e a avaliação da susceptibilidade das cepas foram avaliadas pelo método de difusão de discos, CIM e CBM, obtendo-se halos de inibição com média de 2,02 cm, 1.39 cm, 0,99 cm e 1.13 frente a *E.coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *C. albicans*, respectivamente. Assim, realizou-se, também, o teste do CIM e teste do CBM com base no crescimento dos poços do teste CIM, porém, neste, não houve morte microbiana, apenas inibição microbiana. Pode-se inferir que o óleo essencial de orégano demonstrou alguma atividade antibacteriana, o que se pode tornar uma opção como conservante natural e um maior aprofundamento na pesquisa.

**PALAVRAS-CHAVE:** orégano; óleos essenciais; antimicrobiano.

### ABSTRACT

Oregano oil stands out for its antimicrobial and antioxidant properties, acting as natural preservatives by inhibiting the growth of microorganisms. The objective was to evaluate its antibacterial activity against strains of *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *C. albicans*, and *P. aeruginosa* at extraction times of oil of 1 hour, 1.5 hours, and 2 hours. The extraction method used was hydrodistillation using a Clevenger apparatus. The average yield, volume, and weight were determined, with the 2-hour extraction yielding the best results. Additionally, the average humidity and density were calculated, with relative values for all extraction times. The antimicrobial activity of the oil and the susceptibility of the strains were evaluated using the disk diffusion method, MIC, and MBC, resulting in inhibition zones with an average of 2.02 cm, 1.39 cm, 0.99 cm, and 1.13 cm against *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, and *C. albicans*, respectively. Furthermore, MIC and MBC tests were conducted based on the growth in the MIC test wells; however, in the MBC test, there was no microbial death, only microbial inhibition. It can be inferred that oregano essential oil demonstrated some antibacterial activity, which could make it an option as a natural preservative, warranting further research.

**KEYWORDS:** oregano; essential oils; antimicrobial.

<sup>1</sup> Bolsista da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: cibeleadreoli@hotmail.com. ID Lattes: 6743816534791273

<sup>2</sup> Docente no Curso de Processos Químicos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: vivianelobo@utfpr.edu.br. ID Lattes: 32196208853628

## INTRODUÇÃO

O orégano (*Origanum vulgare L.*) é uma planta da família Lamiaceae, herbácea utilizada como condimento e medicinalmente, sendo-lhe atribuídas diversas indicações, tais como antibacteriano, antifúngico, antiinflamatório, antioxidante, anticancerígeno, emoliente e digestivo (LORENZI, 2002). Vários fatores podem influenciar a atividade antimicrobiana do óleo essencial, sendo a concentração dos compostos ativos o fator mais importante. Os teores variam de acordo com a espécie e maturidade da planta, origem geográfica, época de colheita e a forma de extração do óleo essencial (BURT, 2004).

O presente trabalho objetivou analisar a partir da extração de óleo essencial das folhas de orégano efetuado cálculos de rendimento, densidade, medições de umidade, definições de peso e volume, além de análises microbiológicas.

## METODOLOGIA

A pesquisa envolveu a coleta na cidade de Toledo (latitude -24.7377618 e longitude -53.7576086) e extração de óleo essencial das folhas de *Origanum vulgare* em tempos de 1h, 1:30min e 2h utilizando Clevenger. Após a extração, o óleo essencial foi removido e seco sobre sulfato de sódio anidro, grau p.a para remover a umidade.

A umidade das folhas congeladas de orégano foi medida em cada extração. A densidade para cada extração de óleo é determinada pela razão de massa (g) pelo volume (mL). O rendimento do óleo obtido de cada extração foi expressado como uma porcentagem, calculado pela razão volume (mL) / massa (g).

As amostras de óleo essencial de orégano foram submetidas à análise de atividade antimicrobiana para verificação de possível inibição de atividade da levedura *Candida albicans* (ATCC 10231), e as bactérias *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) pelo protocolo de disco difusão e Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). Todos os testes foram realizados em triplicata.

Com o teste de disco de difusão, óleo essencial foi analisado sem diluição e o método foi sugerido por Bauer (1966), onde as bactérias foram inoculadas por superfície em ágar Mueller Hinton e as leveduras em ágar Sabouraud e verificou-se a presença ou ausência de halo de inibição causado pelos óleos essenciais. (BAUER, 1966).

Já para o teste de CIM a metodologia foi realizada de acordo com Santúrio et al. (2007), Cavalcanti et al. (2011), Pandini et al. (2015) e Teixeira et al. (2020), com modificações, sendo avaliada como a menor concentração do óleo essencial capaz de impedir o crescimento bacteriano.

Por fim, para o teste da concentração bacteriana mínima (CBM) foi executada conforme a abordagem proposta por Weber et al. (2014), com algumas modificações sendo determinada como a menor concentração do óleo essencial capaz de resultar na morte do inóculo.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Observa-se na Tabela 1, um aumento no volume com relação ao tempo de extração, porém, percebe-se que no tempo de 2h ocorreu uma variação considerável no volume de óleo obtido, isso pode ser decorrente de erros na etapa de purificação, ou seja, pode haver presença de água em alguma amostra, gerando uma diferença significativa no volume em caso de comparação com os dados obtidos nas extrações realizadas com o mesmo tempo. Essa diferença de volume também pode ser atribuída ao armazenamento das folhas, visto que ocorreu de algumas amostras perderam o vácuo no armazenamento e conseqüentemente causando uma deterioração do material.

**Tabela 1 - Média de volume, peso, densidade, rendimento e umidade referente a cada tempo de óleo essencial.**

Amostras	Tempo (h)	Volume (mL)	Peso (g)	Densidade(g/mL)	Rendimento (%)	Umidade (%)
A	01:00	0,1350	0,1362	1,0020	0,1375	65,29
B	01:30	0,1901	0,1601	1,0183	0,1779	69,76
C	02:00	0,4636	0,4045	1,0017	0,4509	69,92

Fonte: Autoria Própria (2023).

A partir do volume obtido do óleo, pode-se determinar a massa do óleo, percebendo, também, um aumento de massa em relação ao tempo de extração. Com base nos resultados obtidos da densidade, pode-se perceber que a mesma ficou em torno de 1 em todas as extrações levando em consideração o desvio padrão existente, podendo ser observada na Tabela 2.

**Tabela 2- Desvio padrão das médias de volume, peso, densidade, rendimento e umidade referente a cada tempo de óleo essencial.**

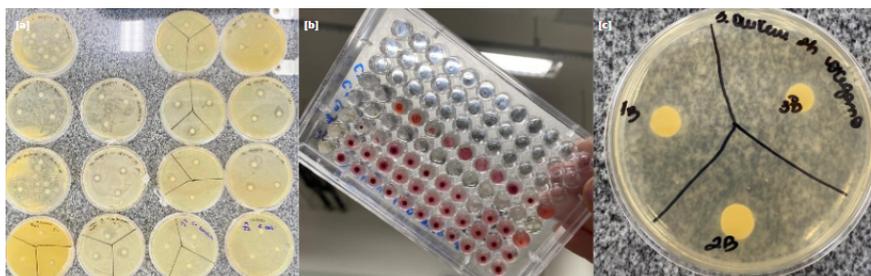
Amostras	Tempo (h)	Volume (mL)	Peso (g)	Densidade(g/mL)	Rendimento (%)	Umidade (%)
A	01:00	0,0540	0,0564	0,0201	0,0582	6,4330
B	01:30	0,0473	0,0163	0,0176	0,0506	2,0764
C	02:00	0,0751	0,0143	0,0104	0,0870	0,9274

Fonte: Autoria Própria (2023).

Ao analisar o rendimento observa-se que houve um aumento mais perceptível com relação ao tempo de 2 horas, ou seja, um aumento no tempo de extração pode aumentar o rendimento da extração. Observando a literatura, tem-se um resultado satisfatório, pois os valores estão de acordo, apresentando uma variação média de 1,2% (Rodrigues et al., 2002 e 2004), (Busatta et al., 2007 e 2008). Além disso, segundo Jerković, Mastelić e Miloš (2001), o rendimento da extração de óleo essencial de orégano por hidrodestilação varia de 0,31 % a 2,33 %.

Por fim, ao observar os dados de umidade percebe-se que a média da umidade do óleo essencial de orégano foi de 68,32% ± 3% de base úmida. Este valor é uma representação média de todas as medições realizadas cada vez que a matéria-prima foi adquirida. Tal média tão alta pode ser decorrente do armazenamento a longo prazo no congelador.

**Figura 1 - Resultados dos testes de de disco difusão, Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).**



Fonte: Autoria Própria (2023). (a) - Alguns dos resultados referente ao teste de Disco de Difusão (b) - Resultado do teste de CIM para cepa *S. epidermidis* (c) - Resultado do teste de CBM referente a cepa de *S. aureus*

Tabela 3. Média dos halos (cm) dos microrganismos do óleo essencial de orégano

Tempo	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>
1 hr	1,15 cm	1,22 cm	n.a	3,2 cm
1:30 hr	1,23 cm	1,70 cm	0,92 cm	1,33 cm
2 hr	1,02 cm	1,25 cm	0,97 cm	1,53 cm
Média	1,13 cm	1,39 cm	0,94 cm	2,02 cm
Controle (+)	-	2,8 cm	3,22 cm	1,71 cm
Controle (-)	-	-	1,1 cm	-

Fonte: autoria própria (2023).

A partir da Figura 1a, fez-se o teste de Disco de Difusão e, sabe-se que a sensibilidade dos microrganismos aos óleos essenciais é determinada pelo tamanho do halo de inibição formado, com diâmetros abaixo de 8 mm considerados resistentes e 9-14 mm como sensíveis (Moreira et al, 2005). A maioria das bactérias testadas foi sensível ao OEO. Entre as cepas Gram-negativas, a *E. coli* mostrou-se a mais sensível tendo um halo de 2,02 cm, enquanto entre as cepas Gram-positivas analisadas, a *S. aureus* foi a mais suscetível possuindo 1,39 cm de halo.

*Pseudomonas aeruginosa* não apresentou halo, possivelmente devido a contaminação ou erros experimentais. Erros foram observados nos controles negativos de *S. epidermidis* e positivos de *C. albicans*, sugerindo novamente, possíveis erros experimentais. Uma possível limitação inclui a retenção de água pelo papel filtro usado no teste, afetando a difusão do óleo e podendo influenciar nos resultados.

No teste de disco, a formação de halos levou à realização do teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) com *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *C. albicans* frente a Figura 1b. A inibição ocorreu principalmente nos primeiros e segundos poços, exigindo altas concentrações do óleo essencial para inibir o crescimento microbiano em concentrações mais baixas.

Alexopoulos et al. (2011) relataram que o óleo essencial de *O. vulgare* foi ativo contra cepas de *S. aureus*, mas a diluição em caldo exigiu concentrações de CIM muito maiores. Isso sugere que algumas cepas precisam de altas concentrações para inibição. Por outro lado, Santos et al. (2011) encontraram diferentes valores de CIM para *E. coli* e *S. aureus* usando a técnica de difusão em disco, o que pode ser devido a diferentes cepas, métodos ou fontes de óleo essencial de orégano. (Santos et al. (2011).

Após a observação da inibição microbiológica nos poços, o teste de Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi conduzido com *E. coli*, *S. epidermidis*, *S. aureus* e *C. albicans* a partir da Figura 1c. No entanto, as placas revelaram crescimento microbiano, indicando a falta de morte celular devido às baixas concentrações inibitórias mínimas. A variação na atividade antimicrobiana entre estudos pode ser atribuída a várias variáveis, como as cepas bacterianas utilizadas e a diversidade dos óleos essenciais, que podem ter concentrações variáveis de princípios ativos devido a flutuações sazonais e fatores geográficos que afetam a composição do óleo essencial qualidade e quantidade. (Sartoratto et al., 2004), (Oliveira et al., 2008).

## CONCLUSÃO

Os óleos essenciais demonstraram alguma eficácia contra microrganismos prejudiciais, sendo alternativa a produtos químicos em diversos setores. No entanto, a probabilidade de as folhas utilizadas estarem em estado de maturação avançada e a perda de material afetou a pesquisa, além de erros experimentais que podem ter impactado a precisão dos resultados levando a necessidade de novos testes.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a Universidade Federal do Paraná (UTFPR) de Toledo, pelo fomento fornecido para a elaboração deste projeto e ao Biopark Educação pela disponibilidade e fornecimento de Laboratórios.

## Conflito de interesse

Não houve conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, A.; KIMBARIS, A.C.; PLESSAS, S.; MANTZOURANI, I.; THEODORIDOU, I.; STAYROPOULOU, E.; POLISSIOU, M.G.; BEZIRTZOGLU, E. **Antibacterial activities of essential oils from eight Greek aromatic plants against clinical isolates of Staphylococcus aureus**. *Anaerobe*, v.17, n.6, p.399-402, 2011.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 94, n. 3, p. 223- 253, 2004.
- LORENZI h, MATOS FJA. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Ed:Nova Odessa, São Paulo. Instituto Plantarum, 2002. 512p.
- BAUER, A.W. et al. **Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk**



- method.** Am. J. Clin. Microbiol., 40: 2413-5, 1966.
- BUSATTA, C., MOSSI, A.J., RODRIGUES, M.R.A., CANSIAN, R.L. AND OLIVEIRA, J.V. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. **Brazilian Journal of Microbiol**, 2007, v. 38, p. 610-616.
- CAVALCANTI, Y. W.; ALMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W. W. N. Screening da atividade antifúngica de óleos essenciais sobre cepas de *Candida*. **Revista de Odontologia Clínico-Científica (online)**, v. 10 n°3, Recife, 2011.
- JERKOVIĆ, I.; MASTELIĆ, J.; MILOŠ, M. The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* grown wild in Croatia. **International Journal of Food Science and Technology**, v.36, p.36, 649-654. 2001.
- MOREIRA, M.R.; PONCE, A.G.; DEL VALLE, C.E.. ROURA, S.I. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *Food Science and Technology*, v. 38, p.565-570, 2005.
- OLIVEIRA, J.V. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. **Brazilian Journal of Microbiol**, 2007, v. 38, p. 610-616.
- SANTÚRIO, J. M.; SANTÚRIO, D. F.; POZZATTI, C. M.; FRANCHIN, P. R. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella* entérica de origem avícola. **Revista Ciência Rural**, v. 14, 2007.
- PANDINI, J. A.; GISELE, F. G. S., SCUR, M. C.; FRANCISCO, L.; ALVES, A.; MARTINS, C. C. Antimicrobial, insecticidal and antioxidante activity of essential oil and extracts of *Guarea kunthiana* A. Juss. **Journal of Medicinal Planta Research**, v. 9, n° 3, p. 48-55. 2015. <https://doi.org/10.5897/JMPR2014.5551>
- RODRIGUES, M.R.A. **Estudo dos Óleos Essenciais Presentes em Manjerona e Orégano**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2002.
- SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELINA, 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 of Microbiology**, v.35, n.4, p.275-280, 2004.
- SANTOS, J.C.; CARVALHO FILHO, C.D.; BARROS, T.F.; GUIMARÃES, A.G. Atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais de orégano, alho, cravo e limão sobre bactérias patogênicas isoladas de vôngole. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v.32, n.4, p.1557-1564, 2011.
- TEIXEIRA, J. J. M.; BESERRA, S. J. O.; SILVA, I. C. L., LIMA, C. G. Análise antimicrobiana dos óleos essenciais de palmarosa (*Cymbopogon martini* (Roxb) J. F. Watson) e pimenta rosa (*Schinus terebenthifolius* Raddi) frente à *Staphylococcus aureus* multirresistentes. **Brazilian Journal of Development**, v.6 n°6, p. 34935- 34953, 2020. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n6-146>
- WEBER, L. D.; PINTO, F. G. S.; SCUR, M. C.; SOUZA, J. G. L.; COSTA, W. F.; LEITE, C. W. Chemical composition and antioxidant activity of essential oil and various plant extracts from *Prunus myrtifolia* (L.) Urb. **African Journal of Agricultural Research**, v. 9, p. 846-853, 27 Feb.2014.