

Actividade antimicrobiana do óleo essencial do *Foeniculum vulgare* Miller

Antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* Miller essential oil

M. T. Tinoco¹, M. R. Martins¹ & J. Cruz-Morais¹

RESUMO

O *Foeniculum vulgare* Mill. subsp. *vulgare* é uma planta espontânea da região mediterrânea, pertencente à família Apiaceae. O seu óleo essencial, principalmente o dos frutos secos, é amplamente utilizado nas indústrias alimentar, farmacêutica, cosmética e perfumaria.

Neste trabalho, pretendeu-se avaliar a actividade antimicrobiana do óleo essencial dos frutos verdes e das folhas da variedade de funcho doce colhido no Alentejo, na região de Évora, e relacionar essa actividade com a respectiva composição química.

A extracção dos óleos essenciais foi efectuada por hidrodestilação e a sua análise foi feita por GC-FID e GC-MS. No óleo das folhas foram identificados como componentes maioritários os fenilpropanóides anetol, fenchona e estragol e o monoterpeneo α -felandreno, enquanto que o óleo dos frutos apresentou como constituintes predominantes anetol e fenchona.

A actividade antimicrobiana dos óleos foi avaliada face às estirpes *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces* spp., *Fusarium oxysporum* e *Penicillium* sp.. Os óleos essenciais apresentaram

actividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *Saccharomyces* spp. e *Fusarium oxysporum*.

ABSTRACT

Foeniculum vulgare Mill. ssp. *vulgare* is a spontaneous plant of Mediterranean region that belongs to the Apiaceae family. Its essential oil is used as additives in food, pharmaceutical, cosmetic and perfume industries mainly that one obtained from dried seeds.

The main goal of this work were to evaluate the antimicrobial activity of essential oils obtained from fresh leaves and unripe seeds of sweet fennel, collected in Évora-Alentejo, in face of their chemical composition.

The extraction of the essentials oils was made by hydrodistillation. Chemical analyses were carried out by GC-FID and GC-MS. Phenylpropanoides anethole, fenchone, estragole and the monoterpene α -phellandrene were the most abundant compounds of leaves essential oil. Seeds essential oil showed as main components anethole and fenchone.

¹ Departamento de Química e Instituto de Ciências Agrárias Mediterrânicas (ICAM), Universidade de Évora; Apartado 94, 7002-554 Évora; e-mail: mftf@evora.pt

Antimicrobial activities were tested against the strains *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces* spp., *Fusarium oxysporum* and *Penicillium* sp..

Seed and leaves essential oils showed antimicrobial activity against *S. aureus*, *Saccharomyces* spp. and *Fusarium oxysporum*.

INTRODUÇÃO

O *Foeniculum vulgare* Miller ssp. *vulgare* var *dulce* (Miller) Thellung, denominado vulgarmente por funcho doce ou erva doce, pertence à família das Apiáceas (Farmacopeia Portuguesa VII, 2002). Distingue-se do funcho amargo pelo sabor doce e anisado das folhas e frutos e pela coloração verde claro ou castanho amarelado dos frutos. É uma planta espontânea da região mediterrânea, Norte de África e Oeste da Ásia. A sua utilização remonta aos tempos da antiga Grécia e Roma, não só pelas propriedades terapêuticas que lhe são atribuídas como também pelas suas propriedades aromáticas (Font-Quer, 1993). Na indústria alimentar é utilizada toda a planta. No entanto, actualmente, o produto com maior utilização é o óleo essencial do fruto seco, o qual tem uma vasta aplicação nas indústrias farmacêutica, cosmética e de perfumaria.

Segundo a Farmacopeia Portuguesa VII (2002), o funcho doce (planta seca) deve apresentar um teor mínimo de 20mL/Kg de óleo essencial e deve conter, no mínimo, 80% de anetol, para ser utilizado como fármaco. Entre as principais propriedades farmacêuticas atribuídas ao óleo do fruto do funcho doce destacam-se a acção carminativa e eupéptica, nas cólicas abdominais, expectorante e anti-espasmódica, na bronquite e asma, e ainda a acção anti-inflamatória, diurética e anti-séptica (Bilia

et al., 2002; Proença-da-Cunha *et al.*, 2003). Os frutos são, ainda, usados na medicina tradicional no tratamento da dismenorreia, possivelmente devido às propriedades anti-espasmódicas do seu óleo essencial (Ostad *et al.*, 2001).

Existem poucas referências na literatura relativamente ao óleo essencial extraído das folhas e dos frutos verdes (Roque & Proença-da-Cunha, 1989; Ruberto *et al.*, 2000), pelo que o presente estudo foi conduzido de modo a determinar a composição química dos óleos da planta verde por GC/FID e GC/MS e avaliar as respectivas actividades antimicrobianas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

As folhas e frutos da planta em estudo foram colhidos em Março de 2004, na Herdade da Mitra, Évora. Previamente à extracção do óleo essencial, o material vegetal foi mantido ao abrigo da luz, em ambiente seco e arejado, durante 3 dias.

Isolamento do óleo essencial

Após a fragmentação das folhas e frutos, os respectivos óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação num aparelho tipo Clevenger, durante 2 horas, de acordo com a Farmacopeia Portuguesa (2002). Os óleos essenciais obtidos foram conservados a 4 °C até análise cromatográfica.

Cromatografia gasosa

Os óleos essenciais foram analisados por GC/FID num cromatógrafo Hewlett Packard 5890, series II, equipado com uma coluna polar SupelcowaxTM10 (30 m x 0,25 mm di., 0,25 mm espessura de filme).

Programa de temperatura do forno: 70 °C (3 min), 70-220 °C (3 °C/min), 220 °C (10 min); temperatura do injector e do detector: 250 °C; gás de arraste: Hélio 0,6 mL/min. Razão de split: 1:50. A quantificação dos componentes foi determinada pelo método de normalização interna com base na área dos picos sem correcção de factor de resposta. As análises por GC/MS foram efectuadas num cromatógrafo TermoFinnigan, com injector automático, modelo AI 3000, utilizando-se parâmetros do GC idênticos aos acima referidos e, ainda, como temperatura da interface: 250 °C; temperatura da fonte do MS: 230 °C; detector tipo quadrupolo; energia de ionização: 70 eV.

As análises de cada uma das amostras dos óleos, óleo essencial das folhas e óleo essencial dos frutos, foram efectuadas em triplicado.

A identificação dos componentes foi feita por comparação dos índices de retenção, calculados em relação a uma série de *n*-alcanos de C₈-C₂₂, e dos respectivos espectros de massa com espectros obtidos com compostos de referência ou publicados na literatura (Adams, 1995).

Actividade antimicrobiana

A actividade antimicrobiana dos óleos foi determinada pelo método de difusão em meio sólido. A actividade antibacteriana foi estudada para os óleos das folhas e frutos face às estirpes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Nos estudos de actividade antifúngica utilizaram-se duas estirpes de leveduras *Saccharomyces* spp., *S. cerevisiae* var. *cerevisiae* e *S. cerevisiae* var. *chevalieri* e duas estirpes de fungos filamentosos: *Fusarium oxysporum* e *Penicillium* sp..

As culturas microbianas foram mantidas a 4 °C em rampas de crescimento contendo NA (Nutriente Agar - Merck), YEP (Yeast

Extract Peptone Agar - Sigma) e PDA (Potato Dextrose Agar - Merck), respectivamente, para bactérias, leveduras e fungos filamentosos.

Os estudos de actividade antimicrobiana foram efectuados em placas de Petri contendo meio de gelose-sangue (BioMérieux) para as estirpes bacterianas, YEP para as leveduras e PDA para os fungos filamentosos. Prepararam-se inóculos de cada um dos microrganismos em solução de NaCl 0,9% (p/p) de modo a obter suspensões com turbidez correspondente a 0,5 na escala de McFarland para as bactérias e leveduras e suspensões contendo 10⁶ ufc.mL⁻¹ para os fungos filamentosos (NCCLS, 1997, NCCLS, 1998; Duru *et al.*, 2004). Cada uma das placas foi inoculada à superfície, por espalhamento, com 200 µL da suspensão do microrganismo correspondente e conservada a 4 °C durante 1h. Posteriormente, foram aplicados sobre os meios, discos de papel de filtro estéreis com 6mm de diâmetro que foram impregnados com 5 µL de cada um dos óleos essenciais. As placas foram incubadas a 37 °C/24h, para cultura das bactérias, a 28 °C/24h, para cultura das leveduras e a 28 °C durante 4 dias para cultura dos fungos filamentosos. Os ensaios de actividade antimicrobiana foram efectuados em triplicado. Como controlos específicos foram usados discos impregnados, respectivamente, com gentamicina (10 µg) e cefalotina (30 µg), para as estirpes de *S. aureus* e *E. coli* e nistatina (200 U), para as estirpes fúngicas (Karaman *et al.*, 2001).

Os resultados da actividade antibacteriana foram submetidos à análise pelo Teste *t* de Student para comparação entre os óleos testados e os controlos. Valores com *P* < 0,05 foram considerados significativos. A análise estatística foi efectuada por SPSS 13.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os óleos essenciais obtidos apresentaram cor levemente amarelada e odor característico, sendo o rendimento da extração de 3,4% (v/p), para o óleo do fruto, e de 0,9% (v/p), para o óleo da folha.

A composição percentual dos óleos está indicada no Quadro 1. Ambos os óleos apresentaram como componentes majoritários o anetol (folha 47,8% e fruto 60,7%), a fenchona (folha 12,6% e fruto 22,8%) e o estragol (folha 10,0% e fruto 3,5%) (Figura 1). O óleo da folha apresentou ainda uma quantidade apreciável de α -felandreno (9,4%) ao contrário do óleo do fruto no qual este composto foi minoritário (1,0%), assim como o mirceno (1,1%) e o α -pineno (0,9%). Como componentes minoritários do óleo da folha, encontraram-se o sabineno (2,2%), o 1,8-cineol (1,6%), o β -pineno (1,3%) e o mirceno (1,2%).

QUADRO 1 – Composição química dos óleos essenciais da *Foeniculum vulgare* Mill.

Componentes (% área)	Folha	Fruto verde
α -Pineno	0,7 \pm 0,0	0,9 \pm 0,1
β -Pineno	1,3 \pm 0,1	0,3 \pm 0,0
Sabineno	2,2 \pm 0,1	0,2 \pm 0,0
Mirceno	1,2 \pm 0,0	1,1 \pm 0,2
α -Felandreno	9,4 \pm 0,2	1,0 \pm 0,1
Limoneno	5,2 \pm 0,2	5,9 \pm 0,2
1,8-Cineol	1,6 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1
γ -Terpineno	1,0 \pm 0,0	0,6 \pm 0,1
Fenchona	12,6 \pm 0,3	22,8 \pm 0,4
Estragol	10,0 \pm 0,2	3,5 \pm 0,1
Anetol	47,8 \pm 0,3	60,7 \pm 0,3

Nota: Os valores representam a média de 3 replicados \pm desvio padrão para cada um dos óleos.

O polimorfismo químico do funcho está relacionado com a grande variabilidade da composição química do seu óleo essencial, sendo a relação entre a quantidade de estragol e anetol utilizada por alguns autores como critério na classificação da planta.

Face aos resultados que obtivemos e tendo em conta Muckensturm *et al.* (1997), poder-se-á concluir que a planta em estudo pertence à subsp. *vulgare* var *dulce*.

Os óleos essenciais encontram-se frequentemente referidos na literatura como sendo produtos com actividade antimicrobiana, actividade esta também referida para alguns dos tipos de compostos que os constituem, nomeadamente os fenilpropanóides, grupo onde se inclui, entre outros, o anetol (Pauli, 2001).

Dado que a literatura refere poucos estudos sobre a actividade antibacteriana e antifúngica do óleo essencial do funcho obtido da planta verde (Ruberto *et al.*, 2000; Tinoco *et al.*, 2005) e como os óleos estudados neste trabalho apresentaram elevado teor de anetol (fruto 60,7% e folha 47,8%), procedeu-se ao estudo do efeito destes óleos sobre o desenvolvimento de estirpes bacterianas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, de leveduras *Saccharomyces* spp. e de fungos filamentosos *Fusarium oxysporum* e *Penicillium* sp..

Os resultados da actividade antibacteriana estão representados no Quadro 2. Estes resultados mostram que o óleo essencial da folha apresentou actividade antibacteriana da mesma ordem de grandeza que o antibiótico controlo gentamicina, para *S. aureus* e actividade antibacteriana inferior à cefalotina no estudo efectuado com *E. coli*. O óleo do fruto apresentou um halo de inibição superior ao observado com a gentamicina face a *S. aureus* ($P < 0,05$) e inferior ao obtido com a cefalotina para *E. coli* ($P < 0,05$). Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos num estudo efectuado por Ruberto *et al.* (2000), no qual também foi observada actividade do óleo do funcho comum face às estirpes de *S. aureus* e de *E. coli*.

A actividade antifúngica manifestada pelos óleos do funcho foi semelhante à do

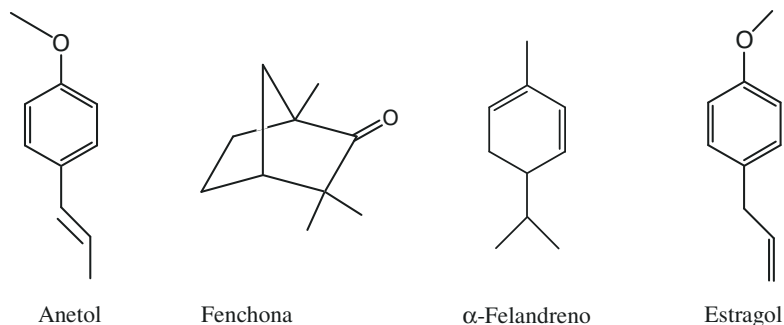


Figura 1 – Estrutura química dos principais componentes dos óleos essenciais do *Foeniculum vulgare*

QUADRO 2 - Actividade antimicrobiana dos óleos essenciais da folha e fruto verde do *Foeniculum vulgare* Mill

Microrganismos	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	Diâmetro da zona de inibição em mm (24h)			
Óleo folha	8,1 \pm 0,3	ns	7,7 \pm 0,2	*
Óleo fruto	9,2 \pm 0,2	*	8,0 \pm 0,1	*
Anetol	9,0 \pm 0,3	*	nd	*
Estragol	8,7 \pm 0,2	*	9,1 \pm 0,1	*
Fenchona	7,1 \pm 0,1	*	nd	*
Cefalotina	---	----	12,1 \pm 0,2	
Gentamicina	7,9 \pm 0,1		---	----

nd – não detectado; --- – não testado; ns – não significativo; * $P < 0,05$

controlo nistatina, provocando inibição total das estirpes *Saccharomyces* spp.. Face a *Fusarium oxysporum* observaram-se halos de inibição de 7,0 \pm 0,2 mm, tanto para os óleos como para a nistatina. Para *Penicillium* sp., os óleos em estudo produziram halos de inibição de 9,0 \pm 0,1 mm, os quais foram manifestamente inferiores aos que se obtiveram com a nistatina usada como controlo (20,9 \pm 0,8 mm).

No Quadro 2, podemos também observar os resultados obtidos com os componentes maioritários puros dos óleos estudados: estragol, anetol e fenchona. O estragol e o anetol apresentaram actividade antibacteriana frente a *S. aureus* da mesma ordem de grandeza que a obtida com o óleo do fruto e superior à do controlo gentamicina ($P < 0,05$). No entanto,

face à estirpe de *E. coli.*, nem o anetol, nem a fenchona apresentaram actividade detectável, enquanto que o estragol produziu um halo de inibição superior ao observado com os óleos, mas inferior ao do controlo cefalotina ($P < 0,05$).

CONCLUSÕES

Face aos resultados apresentados neste trabalho, poder-se-á concluir que os óleos essenciais da folha e do fruto verde de funcho doce possuem actividade contra *S. aureus* e *Saccharomyces* spp.. No óleo do fruto, essa actividade foi superior à manifestada pela gentamicina ($P < 0,05$) e idêntica à actividade observada com a nistatina, antimicrobianos típicos usados neste

trabalho como controlos positivos. As actividades observadas foram semelhantes às manifestadas pelos componentes maioritários anetol, estragol, quando usados individualmente frente a *S. aureus* e *Saccharomyces* spp.. Além disso, os óleos evidenciaram actividade semelhante à produzida pela nistatina face a *Fusarium oxysporum* e actividade inferior à dos controlos cefalotina e nistatina frente às estirpes de *E. coli* e *Penicillium* sp.. Apesar de na literatura se encontrarem estudos que indicam que alguns compostos puros isolados de óleos voláteis, incluindo o anetol, apresentam actividade antimicrobiana (Curtis *et al.*, 1996; De *et al.*, 2002), apenas o estragol apresentou actividade antimicrobiana evidente em todos os ensaios em que os óleos foram activos, pelo que muito provavelmente, entre os componentes maioritários do óleo essencial será o estragol aquele que dará um maior contributo para a actividade do óleo essencial do *Foeniculum vulgare*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao:

- Doutor Pablo Pereira do LMI-INETI pela colaboração prestada na identificação dos fungos filamentosos.

- ICAM (Instituto de Ciências Agrárias Mediterrânicas) e CEEM (Centro de Estudos de Ecosistemas Mediterrânicos) ambos da Universidade de Évora pela utilização de equipamentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams R. P. 1995. *Identification of essential oil components by gas-chromatography-mass spectroscopy*.

Allured Publishing Corporation, Illinois, USA.

Bilia, A. R., Flamini, G., Taglioli, V., Morelli, I. & Vincieri, F. F. 2002. GC-MS analysis of essential oil of some commercial Fennel teas. *Food Chemistry*, **76**: 307-310.

Curtis, O. F., Shetty, K., Cassagnol, G., & Peleg, M. 1996. Comparison of synthetic and lethal effects of synthetic versions of plant metabolites (anethole, eugenol, carvacrol, thymol) on food spoilage yeast (*Debaromyces hanenei*). *Food Biotechnology*, **10**: 55-73.

De, M., De, A. K., Sen, P., & Banerjee, A. B. 2002. Antimicrobial properties of star anise (*Illicium verum* Hook f). *Phytotherapy Research*, **16**: 94-95.

Duru, M.E., Öztürk, M., Ugur, A. & Özgür, C. 2004. The constituents of essential oil and in vitro antimicrobial activity of *Micromeria cilicica* from Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, **94**: 43-48.

Farmacopeia Portuguesa VII. 2002. Vol. 2, pp 175-176. Infarmed, Lisboa.

Font-Quer, P.1993. *Plantas Medicinales, El Dioscórides Renovado*, Tomo II, pp. 498-500. Editorial Labor S.A., Barcelona.

Karaman, S., Digrak, M., Ravid, U. & Ilcim, A. 2001. Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, **76**: 183-186.

Muckensturm, B., Foechterlen, D., Reduron, J. P., Danton, P. & Hildenbrand, M. 1997. Phytochemical and Chemotaxonomic Studies of *Foeniculum vulgare*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **25**: 353-358.

NCCLS 1997. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility

- testing of yeasts. Approved standard M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- NCCLS 1998. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard M38-P. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1998.
- Ostad, S. N., Soodi, M., Shariffzadeh, M., Khorshidi, N. & Marzban, H. 2001. The effect of fennel essential oil on uterine contraction as a model for dysmenorrhea, pharmacology and toxicology study. *Journal of Ethnopharmacology*, **76**: 299-304.
- Pauli, A. 2001. Antimicrobial properties of essential constituents. *International Journal of Aromatherapy*, **11**: 126-133.
- Proença-da-Cunha, A. Silva, A. P. & Roque, O. R. 2003. *Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- Roque, O.R. & Proença-da-Cunha, A. 1989. Composição do óleo essencial de *Foeniculum vulgare* Miller, espontâneo do Algarve. *Bol. Fac. Farm. Coimbra*, **13**: 45-52.
- Ruberto, G., Baratta, M. T., Deans, S.G. & Dorman, H. J. D. 2000. Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. *Planta Medica*, **66**: 687-693.
- Tinoco, M. T., Martins, M. R. & Cruz-Morais, J. 2005. Actividade antimicrobiana do óleo essencial do *Foeniculum vulgare* Miller. *Livro de Resumos - Jornadas ICAM*, Évora, Portugal, p.143.