

Evaluarea compoziției chimice și a efectului antimicrobian a uleiului esențial de Tuia

Evaluation of the chemical composition and antimicrobial effect of Thuja essential oil

Eugenia Dumitrescu, Mihai Folescu, Romeo T. Cristina
Facultatea de Medicina Veterinara Timisoara

eugeniadumitrescu@usvr.ro

Cuvinte cheie: ulei esențial de Tuia, chimic, antimicrobian

Keywords: Thuja essential oil, chemical, antimicrobial

Rezumat

Pornind de la considerentul că, proprietățile farmacologice și cele terapeutice ale unui ulei esențial sunt date de componentele lor chimice, componente care diferă în funcție de proveniență, sol, temperatură, umiditate etc., ne-am propus să determinăm conținutul în compuși volatili a uleiului esențial de tuia procurat din comerț și să testăm efectul antimicrobian al acestuia. Obiectivele cercetării au fost de a identifica compoziția chimică a uleiului esențial de tuia prin metoda GS-MS și de a testa efectul antimicrobian asupra unor specii gram pozitive și gram negative. Rezultatele obținute au arătat că, uleiul esențial de Tuia are efecte inhibitoare semnificative împotriva unor bacterii gram-pozitive și gram-negative, care sunt asociate cu boli clinice; este mai eficient împotriva gram pozitivilor decât a gram negativilor; ineficient împotriva *Salmonella typhimurium* iar, componentele majore identificate au fost: α -pinenul, 3-carene, terpinolene, limonen, β -myrcene și camphene. Prezența acestor compuși arată că, uleiul esențial de tuia posedă un mare potențial de utilizare în multe aplicații medicale.

Abstract

Starting from the consideration that the pharmacological and therapeutic properties of an essential oil are given by their chemical components, components that differ depending on the origin, soil, temperature, humidity, etc., we set out to determine the content of volatile compounds in the oil essential thuja purchased from the trade and to test its antimicrobial effect. The objectives of the research were to identify volatile compounds from thuja essential oil by the GS-MS method and to test the antimicrobial effect on gram positive and gram negative species. The obtained results showed that Thuja essential oil has significant inhibitory effects against gram-positive and gram-negative bacteria, which are associated with clinical diseases; it is more effective against gram positives than gram negatives; ineffective against *Salmonella typhimurium* and the major components identified were: α -pinene, 3-carene, terpinolene, limonene, β -myrcene and camphene. The presence of these compounds shows that thuja essential oil has a great potential for use in many medical applications.

1. Introducere

Thuja spp este un conifer hermafrodit, încadrat în genul *Thuja*, subfamilia *Thujoideae*, Familia *Cupressaceae*. Denumirea populară a acestui arbore este „arborele vieții” [12].

Din genul *Thuja* fac parte 2 specii care sunt originare din America de Nord (*Thuja occidentalis*, *Thuja plicata*) și 3 specii originare din Asia de Vest (*Thuja koraiensis*, *Thuja standishii*, *Thuja sutchuenensis*) [1]. Părțile medicinale sunt reprezentate de frunze, conuri și tulpină, din care se pot obține tincturi, extracte și uleiuri esențiale.

În secolul XIX arborii din acest gen se foloseau sub formă de tinctură sau unguent pentru tratarea verucilor, negilor, dermatofitozelor și a candidozei orale.

Indigenii din Canada, foloseau frunzele de *Thuja occidentalis* pentru a face ceai pe care îl consumau pentru prevenția scorbutului. S-a demonstrat că acesta conține 50 mg vitamina C în 100 g produs [9].

De-a lungul timpului s-au demonstrat efectele antivirale, antioxidante, antimicrobiene și anti-diareice ale extractelor de *Thuja occidentalis*, extracte care au fost folosite

pentru a trata catarul bronhial, cistita, psoriazisul, carcinoamele uterine și reumatismului. Uleiul esențial obținut din acești arbori are în componență thujonă, substanță care a fost studiată pentru efectul antagonist asupra receptorilor GABA [10].

În prezent se folosesc uleiurile esențiale sau tincturile, ambele cu efect antibacterian. S-a demonstrat că extractul de *Thuja* are efect antibacterian, acționând atât asupra bacteriilor Gram pozitive cât și pe cele Gram negative [4].

Acesta, este folosit mai des în tratarea infecțiilor acute sau cronice ale tractului respirator superior, ca antibiotic adjuvant în infecțiile bacteriene severe, cum ar fi bronșita, angina, faringita, otita medie și sinuzita. Proprietățile imunostimulatoare și antivirale se bazează pe creșterea proliferării limfocitelor T și producerea interleukinei-2.

Din punct de vedere chimic, tuia conține o serie de compuși: saponine, fenoli, taninuri, amine, mucilagii, principii amari, compuși lactonici, carotene, uleiuri esențiale, triterpene, steroli, glucide reducătoare, cumarine, acid tanic, polizaharide, proteine și minerale.

Dintre toate aceste componente, flavonoidele și lignanii sunt reprezentativi compuși pentru acest grup de arbori. Din grupul flavonoidelor au fost identificate: catechina, galocatechina, mearusitrina, myricetina, procyanidina B-3, prodelphinidina, quercetina, quercitrinul și camferol iar, dintre bioflavonoide au fost evidențiate: bilobetina și amentoflavona [2].

Amentoflavona, compus prezentă într-o cantitate considerabilă în *T. occidentalis* prezintă activitate mare antifungică împotriva unor fungi cu patogenitate înaltă și proprietăți antivirale împotriva virusului respirator sincițial.

De asemenea, lignanii sunt polifenoli care de-a lungul timpului au fost asociați cu o puternică activitatea antioxidantă, antivirală, antibacteriană, insecticidă și nematodicidă [13].

Thuja occidentalis posedă o serie de proprietăți farmacologice, care sunt exercitate de substanțe active precum: α -pinina, d- α -tujona, 1-frencona, 1-broneolul acetic, acidul andisovaleric, terpineolul, sabiena, camfenul, acidul camfor valerianic, occidol- β -sitoserolul, quercetin rhodoxantina, taninuri, mucilagii și

vitamina C [3, 7]. De asemenea, activitatea hepatoprotectoare a fost demonstrată prin protecția pe care o asigură ficatului în insuficiență hepatică acută sau cronică, prin intermediul flavonoidelor, taninurilor și polizaharidelor [5].

Compușii fenolici acționează protector asupra mucoasei gastrice în leziunile provocate de aspirină, stres, alcool sau acid clorhidric [6].

2. Materiale și metode

2.1. Uleiul esențial de Thuja

În studiu a fost folosit uleiul esențial de tuia, ulei procurat din comerț. Din specificațiile producătorului, ulei de tuia a fost obținut prin distilarea ramurilor și a scoarței de tuia cu vapori de apă. Acesta are o aromă lemnoasă, caldă, cu miros de pământ.



Figura 1. Ulei esențial de Tuia

2.2. Identificarea compușilor volatili

Identificarea compușilor volatili din uleiul esențial de tuia s-a realizat prin metoda GC-MS. Analiza probei luată în studiu s-a realizat cu ajutorul gaz cromatografului Agilent Technology 7820A (AGILENT Scientific, Santa Clara, CA, SUA), cuplat cu spectrometrul de masă MSD 5975 și dotat cu o coloană capilară DB WAX (30 m x 250 μ m x 0,25 μ m). Gazul folosit a fost heliu cu un debit de masă de 1 ml / min.

Pentru separarea compușilor, s-a folosit următorul program de cuptor: 40 °C timp de 1 min, 5 °C min⁻¹ până la 210 °C timp de 5 min. Temperaturile injectorului și ale sursei de ioni au fost de 250 și respectiv 150 °C. Volumul de injecție a fost de 1 μ l din fiecare ulei sau amestec pur, fără solvent, cu un raport de divizare 1:20. Pentru identificarea compușilor volatili a fost utilizată biblioteca de spectre NIST. Identificarea a fost făcută prin

compararea spectrelor de masă cu cele stocate în bibliotecile NIST 02, Wiley 275. Valoarea procentuală a componentelor individuale a fost calculată pe baza zonelor de vârf ale GC fără a utiliza factori de corecție.

2.3. Testarea efectului antimicrobian

Testarea efectului antimicrobian a uleiului esențial de tuia s-a realizat prin metoda discurilor, conform *Normelor Standard pentru Testarea Sensibilității Antimicrobiene a Discurilor Impregnate*.

Pentru testarea efectului antimicrobian a uleiului esențial de tuia, s-au folosit tulpini de catalog din două specii bacteriene Gram negative (*Proteus vulgaris* și *Salmonella typhimurium*) și două specii Gram pozitive (*Staphylococcus aureus* și *Bacillus subtilis*).

Din speciile bacteriene testate au preparat inițial culturi tinere de 24 de ore după cum urmează: pe o placă Petri cu geloză nutritivă s-au făcut însămânțări cu ansa bacteriologică pentru obținerea de colonii izolate. Acestea au fost incubate la termostat timp de 24 ore la 37 °C, iar din fiecare cultură corespunzătoare speciilor bacteriene folosite în testare s-a preluat o colonie cu o ansă bacteriologică care s-a trecut în 10 ml bulion nutritiv.

Aceste tuburi cu bulion s-au incubat apoi la termostat timp de 24 ore la 37 °C, fiind considerate culturi proaspete și pure.

Din fiecare specie bacteriană aleasă pentru testare s-au făcut apoi diluții pentru a obține o densitate celulară de 10⁷/ml. Verificarea densității s-a realizat cu scara McFarland.

În vederea testării mediul de cultură, geloză nutritivă s-a turnat în plăci Petri sterile. S-a folosit câte o placă pentru fiecare cultură bacteriană. După solidificarea mediului, plăcile s-au menținut la termostat aproximativ 15 minute pentru eliminarea condensului care se formează pe capacul plăcilor datorită diferenței de temperatură dintre placă și mediul de cultură. Apoi, pe suprafața mediului de cultură repartizat în plăci s-a însămânțat câte 1 ml, din fiecare cultură pregătită.

Prin mișcări de rotire s-a realizat repartizarea uniformă a culturii pe suprafața mediului. Excesul de lichid s-a aspirat. Plăcile s-au lăsat apoi în repaus timp de 15 minute pentru

ca, corpii bacterieni să facă contactul cu mediul de cultură. Au fost folosite discuri sterile Whatman (6mm) care au fost încărcate cu 20 μl ulei esențial de tuia și depuse pe mediul de cultură inoculat. Plăcile au fost incubate la 37°C pentru 24 h.

Activitatea antimicrobiană a uleiului esențial de tuia a fost studiată pe trei concentrații: 25%, 50%, 75% de ulei esențial. Plăcile au fost incubate timp de 24 de ore la 37°C, după care a fost măsurat diametrul zonei de inhibiție și exprimat în mm. Controlul negativ a fost pregătit folosind DMSO ca și solvent, și amoxicilină ca și control pozitiv.

Toate determinările au fost realizate în triplicat iar pentru analiza statistică a fost folosit soft-ul pentru evaluarea unei analize unilaterale a varianței (ANOVA) la $p \leq 0.05$.

3. Rezultate și discuții

3.1. Compușii identificați

În urma analizei gaz cromatografice cuplată cu spectrometrie de masă, pentru uleiul esențial de tuia au fost identificați următorii compuși prezentați în tabelul 1 și figura 2.

Tabelul 1.
Compușii volatili identificați în uleiul esențial de tuia

Compusul	R.I	Conc.%
Monoterpene - hidrocarburi		
1 α -Pinene	935	22.25
Camphene	947	1.32
Sabine	970	0.54
β -Pinene	974	0.88
β -Myrcene	992	2.16
3-Hulls	1012	20.47
p-Cymene	1020	0.49
Limonene	1024	3.38
Terpinolene	1092	4.58
Monoterpene - oxigenate		
terpinene-4-ol	1172	0.58
α-Terpinyl acetate	1280	2.72
Sesquiterpene hidrocarburi		
β -Element	1386	0.36
α-Cedrene	1412	0.81
β -Caryophyllene	1416	6.12
α-Humulene	1452	5.57
γ -Cadinene	1476	0.40
δ -Cadinene	1479	0.81
Sesquiterpene oxigenate		
Spathulenol	1511	1.12
α-Cadinol	1541	0.67
Caryophyllene oxide	1581	0.62
Cedrol	1654	19.21

În urma analizei gaz cromatografice în uleiul esențial de tuia au fost identificate 21 componente, acestea însumând 95,06% din compoziția totală de ulei esențial și reprezintă patru grupe diferite de hidrocarburi, și anume; *hidrocarburi monoterpenice*, *monoterpene oxigenate*, *hidrocarburi sesquiterpenice* și *sesquiterpene oxigenate*.

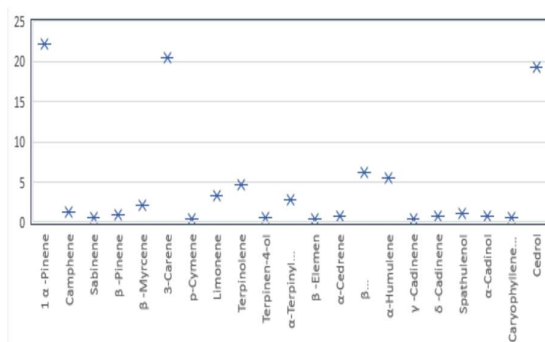


Figura 2. Compușii identificați în uleiul esențial de Tuia

Hidrocarburile monoterpenice au constituit grupul chimic cel mai dominant (56,07%) și dintre componente α -pinenul (22,25%) este cel mai predominant urmat de 3-carene (20,47), terpinolene (4,58), limonen (3,38), β -myrcene (2,16) și camphene (1,32).

Monoterpenele oxigenate însumează 3,3% din componentele uleiului esențial de tuia, iar cea mai mare proporție a fost a acetatului de α -terpinil (2,72).

Hidrocarburile sesquiterpene au fost în proporție de 14,07%, acestea incluzând ca și compuși predominanți β -cariofilen (6,12) și α -humulen (5,57).

Sesquiterpenele oxigenate reprezintă 21,62% din compoziția uleiului esențial de tuia și au avut ca și componente majore cedrol (19,21) și spathulenol (1,12).

Compoziția uleiului esențial a arătat unele asemănări cu studii anterioare realizate de alți cercetători, dar cu diferențe în ceea ce privește regiunea în care planta a fost cultivată.

De exemplu, componentele majore din uleiul esențial de *T. orientalis* provenit din Iran sunt: pinenă (21,9%), cedrol (20,3%), D-3-carenă (10,5%), și limonenă (7,2%), în timp ce la cel provenit din Himalaya conținutii majori sunt: pinenă (29,2%), D-3-carenă (20,1%), cedrol (9,8%), cariofilen (7,5%) și limonenă

(5,4%). Aceste diferențe se datorează variabilității genetice, condițiilor de climat, sezonului de recoltare, compoziției solului și procesului de uscare [21].

Un alt studiu realizat în Pakistan a arătat că, uleiul esențial de tuia are 22 de componente principale reprezentate de: α -pinen (40,6 %), beta-caryophyllene (6.8%), cedrol (10.7 %), alloaromadendrene (7.8 %) și β -mircen (3,7 %) și R-+limonen (3.2 %) iar un alt studiu realizat în Egipt pune în evidență 23 componente principale, cele mai predominante fiind α pinenul (21,83%), β -pinenul (6,71%), β -cariofilina (12,07), α -cedrol (6,86%), β -selinen (6,15%), limonine (5,49%) [11, 18].

3.2. Activitatea antimicrobiană *in vitro*

Activitatea antimicrobiană *in vitro* a uleiului esențial de tuia împotriva unor microorganisme a fost evaluată calitativ și cantitativ prin metoda de microdiluție. Diametrele zonelor de inhibiție produse de uleiul esențial de tuia împotriva microorganismelor testate sunt prezentate în tabelul 2 și figura 3.

Tabelul 2.

Diametrele zonelor de inhibiție produse de uleiul esențial de Tuia

Inhibition zone halo diameter (mm)				
Gram positive				
Conc.	25%	50%	75%	Amox
<i>B. subtilis</i>	12.6±0.14	14.8±0.11	30.12±0.16	39.4±0.11
<i>St. aureus</i>	21.8±0.12	24.18±0.12	35.42±1.08	N/A
Gram negative				
<i>P. vulgaris</i>	N/A	N/A	18.05±0.7	42.2±0.32
<i>S. typhimurium</i>	N/A	N/A	N/A	15.4±0.18

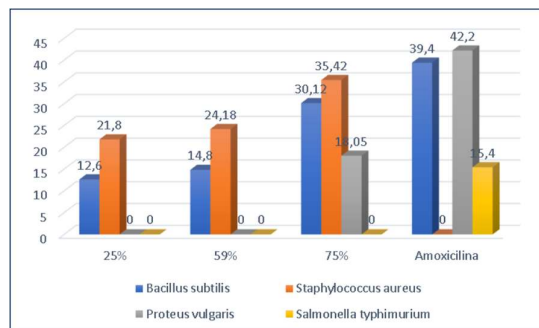


Figura 3. Reprezentarea grafică a zonei de inhibiție (mm) la cele trei concentrații de ulei esențial de tuia

Rezultatele obținute pentru uleiul esențial de tuia au arătat că, acesta are cea mai mare

activitate împotriva gram pozivilor *Staphylococcus aureus* (35,42±1,08) și *Bacillus subtilis* (30,12±0,16), în timp ce, aceasta nu a arătat nici o activitate împotriva *Salmonella typhimurium* (gram negativ), iar în cazul patogenului gram negativ *Proteus vulgaris*, activitatea antimicrobiană a fost obținută numai la concentrația maximă aplicată (18,05±0,7 comparativ cu 42,2±0,32 la amoxicilină).

Rezultatele obținute în acest studiu sunt asemănătoare și cu ale altor cercetători care, susțin activitatea antimicrobiană a uleiului esențial de tuia, în special împotriva patogenilor gram pozitivi [15, 20].

Într-un alt studiu *in vitro*, s-a pus în evidență activitatea puternică antimicrobiană a extractului metanolic de *T. occidentalis* împotriva unor bacterii Gram-negative și Gram-pozitive (*Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Shigella flexenari*, *Yersinia aldovae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) și fungi (*Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus parasiticus*, *Trichophyton rubrum*, *Yersinia aldovae and Candida albicans*) [16, 19].

Constituenți ai uleiului esențial de *T. occidentalis* ca: sabinyll acetat, fenconă, sabienă, β-thujonă, α-pinenă și terpinen-4-ol au demonstrat că acesta are activitate antimicrobiană împotriva *S. aureus*, *E. coli*, *E faecalis*, iar α-tujona și β-tujona sunt foarte active împotriva bacteriilor Gram negative (*Pseudomonas aeruginosa* și *Klebsiella pneumoniae*).

În studiile făcute pentru determinarea efectului inhibitor al *T. occidentalis* asupra *Pseudomonas aeruginosa* folosind tehnica densității optice, s-a demonstrat că extractele apoase și alcoolice de *T. occidentalis* au fost eficiente împotriva *P. aeruginosa* la o concentrație de 50%, în timp ce la o concentrație de 10% aceste extracte au fost mai puțin eficiente.

Activitatea antibacteriană și antimicrobiană a uleiurilor esențiale obținute din frunze și conuri de *T. occidentalis* a fost testată asupra a șapte microorganisme: *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Aspergillus flavus* și *Aspergillus niger*. Ambele uleiuri au fost eficiente, dar o

activitatea microbiană mai crescută s-a observat la uleiul esențial obținut din frunze. Efectul antifungic a fost cel mai puternic. Se consideră că această proprietate a uleiurilor se datorează pinenei, care este componentul major al ambelor uleiuri [8, 14, 17].

4. Concluzii

În urma studiului efectuat pe uleiul esențial de tuia procurat din comerț, privind analiza cromatografică și testarea eficacității antimicrobiene, putem concluziona că: uleiul esențial de Tuia are efecte inhibitoare semnificative împotriva unor bacterii gram-pozitive și gram-negative, care sunt asociate cu boli clinice; este mai eficient împotriva gram pozitivilor decât a gram negativilor; ineficient împotriva *Salmonella typhimurium* iar, componentele majore identificate au fost: α-pinenul, 3-carene, terpinolene, limonen, β-myrcene și camphene. Prezența acestor compuși arată că, uleiul esențial de tuia posedă un mare potențial de utilizare în multe aplicații medicale.

Bibliografie

1. Alves, L.D.S., Figueirêdo, C.B.M., Silva, C.C.A.R., Marques, G.S., Ferreira, P.A., Soares, M.F.R., Silva, R.M.F., Rolim-Neto, P.J., **2014**, *Thuja Occidentalis L. (Cupressaceae)*, *Review of Botanical, Phytochemical, Pharmacological and Toxicological Aspects*, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 5(4):1163-1177.
2. Aragón, Z., **2005**, *Lignanols (I): estructura y funciones en las plantas*, *Revista de fitoterapia*, 5 (1): 55-68.
3. Bellili, S., Aouadhi, C., Dhifi, W., Ghazghazi, H., Jlassi, C., Sadaka, C., El Beyrouthy, M., Maaroufi, A., Cherif, A., Mnif, W., **2018**, *The Influence of Organs on Biochemical Properties of Tunisian Thuja occidentalis Essential Oils*, *Symmetry*, 10(11):649
4. Bushra, M., **2017**, *Study of the inhibitory effect of Thuja occidentalis against Pseudomonas aeruginosa isolated from surgical wounds in vitro and in vivo*, *International Journal of Science and Nature*, 8(2):352-357
5. Dubey, S.K., Batra, A., **2008**, *Hepatoprotective activity from ethanol*

- fraction of Thuja occidentalis Linn.*, Asian Journal of Research in Chemistry, 1(1): 32-35.
6. Dubey, S.K., Batra, A., **2009**, *Role of phenolic compound rich ethanol fraction of Thuja occidentalis Linn. in protective mechanism*, Journal of Pharmacy Research 2(2): 217-225.
 7. Dut Jasuja, N., Sharma, S., Choudhary, J., Joshi, S.C., **2013**, *Essential Oil and Important Activities of Thuja orientalis and Thuja occidentalis*, Journal of Essential Oil Bearing Plants, 18(4):931-949
 8. Gupta, G., Srivastava, A.K., **2002**, *In vitro activity of Thuja occidentalis Linn. against human pathogenic Aspergilla*, The Homeopathic Heritage, 27(1): 5-12.
 9. Hoffmann, D., **2003**, *Medical Herbalism: Principles and Practices*, Healing Arts Press p.588.
 10. Hold, K.M., Sirisoma, N.S., Ikeda, T., Narashashi, T., Casida, J.E., **2000**, *Alpha-thujone (the active component of abshinte): gamma-aminobutyric acid type A receptor modulation and metabolic detoxification*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97(8):3826-31.
 11. Ibrahim, Magda T., Nevein, M., Abdel-Hady., Lamiaa, N., Hammad., **2004**, *GC/MS Analysis and biochemical studies of the essential oil of Thuja Orientalis L. growing in Egypt*. Bull. Fac. Pharm. Cairo Univ., Vol. 42, No. 1.
 12. Jahan, N., Ahmad, M., Zia-Ul-Haq M., Alam, S., Qureshi, M., **2010**, *Antimicrobial screening of some medicinal plants of Pakistan*, Pakistan Journal of Botany 42(6): 4281-4284.
 13. Johnston, WF., **2008**, *Thuja occidentalis, Conifers. Silvics of North America*, Washington, D.C.
 14. Kéita, S.M., Vincent, C., Schmidt, J.P., Arnason, J.T., **2001**, *Insecticidal effects of Thuja occidentalis (Cupressaceae) essential oil on Callosobruchus maculatus [Coleoptera:Bruchidae]*, Canadian Journal of Plant Science, 81(1):173-177.
 15. Lis, A., Liszkiewicz, R., Krajewska, A., **2016**, *Comparison of chemical composition of the essential oils from different parts of Thuja occidentalis L. 'Brabant' and T. occidentalis L. 'Smaragd'*, Herba Polonica, 62(3):20-27.
 16. Mohamad, J. K., Ghaytha, M., Bahira, Z., **2016**, *Antibacterial and Phytochemical Investigation of Thuja orientalis (L.) Leaves Essential Oil from Syria*, IJCPR, Volume 7(5).
 17. Naser, B., Bodinet, C., Tegtmeier, M., Lindequist, U., **2005**, *Thuja occidentalis (Arbor vitae): A Review of its pharmaceutical, pharmacological and clinical properties*, Evidence-based complementary and alternative medicine, (1): 69-78.
 18. Riaz, M., Rashid, M. K., Chaudary, F. M., **2005**, *Volatile Constituents of the Leaves Pakistani Cumpressus sempervirens and Thuja orientalis*, Pakistan Journal of Science and Industrial Research, Vol. 42, No. 2, pp.98-101
 19. Shiv Nandan, S., Sunil, R., Man Kumar, T., **2017**, *Antibacterial Effects of Thuja Leaves Extract*, International Journal of Applied Sciences and Biotechnology, 5(2):256-260.
 20. Tsiri, D., Graiku, K, Poblock-Olech, L., Krauze-Baranows, M., Spyropoulos, C., Chinou, I., **2009**, *Chemosystematic Value of the Essential Oil Composition of Thuja species Cultivated in Poland – Antimicrobial Activity*, Molecules 14(11):4707-4715.
 21. Wajaht, A.S., Mahpara, Q., **2014**, *Chemical composition, Antioxdant and Antibacterial activity of Thuja Orientalis essential oil*. World Journal of Pharmaceutical Sciences, 2(1): 56-61.