

ATIVIDADE ANTI- *CANDIDA* DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS UTILIZADAS NA CULINÁRIA

Natália Ruggeri Barbaro

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Centro de Ciências da Vida
naty_barbaro@yahoo.com.br

Profa. Dra. Maria Magali Stelato

Grupo de Pesquisa: Controle de Qualidade Microbiológico e Físico-químico de Alimentos e Fitoterápicos
Centro de Ciências da Vida
magalisoares@puc-campinas.edu.br

Resumo: *Esse estudo visou a extração de óleos essenciais de plantas utilizadas na culinária, Zingiber officinalis, Cominum cyminum, Crocus sativus, Coriandrum sativum, Thymus vulgaris, Ocimum basilicum e Myristica fragrans, através de processo de destilação por arraste a vapor d'água. Posteriormente foi verificada a atividade desses óleos sobre diferentes espécies de Candida pela técnica de difusão em disco e diluição em caldo como preconizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M44-A (2004) e CLSI M27- A2 (2002), respectivamente. Foi observado no teste de difusão que os óleos essenciais que tiveram melhor atividade foram Thymus vulgaris, Ocimum basilicum e Cominum cyminum obtendo-se halos de inibição que variaram de 30 a 50 mm 30 a 150 mm e 18 a 150mm respectivamente. Foram realizados os testes de diluição com esses óleos e, a atividade de T. vulgaris frente a C. albicans ATCC 90028 foi CIM = 8100 µg/mL e CFM = 9900 µg/mL e para C.krusei ATCC 6258 e C. parapsilosis ATCC 22019 CIM = 8181 µg/mL e CFM = 14400 µg/mL e 21600µg/mL, respectivamente. Para óleo de O. basilicum frente a C. albicans ATCC 90028 obteve-se CIM = 21600µg/mL e CFM = 25200µg/mL, C.krusei ATCC 6258 CIM = 25200µg/mL e CFM = 36000µg/mL e C. parapsilosis ATCC 22019 CIM = 18000µg/mL, no entanto não apresentou atuação antifúngica para essa cepa nas concentrações testadas. Os óleos T. vulgaris e O. basilicum evidenciaram atividade anti-Candida, no entanto T. vulgaris foi o que apresentou menores CIMs. Estudos in vivo devem ser realizados para comprovar a atuação na terapêutica.*

Palavras-chave: óleos essenciais; atividade antifúngica, *Candida ssp.*

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde- Farmácia- FAPIC/REITORIA.

1. INTRODUÇÃO

Candida ssp são microrganismos oportunistas, estão amplamente distribuídos na natureza e fazem parte da microbiota de diversas pessoas. Esa leve-

dura pode ser transmitida por contato, pela mucosa oral, via iatrogênica, entre outras, podendo causar desde doenças cutâneo-mucosas a sistêmicas em pessoas que possuam algum fator predisponente[8]. Frequentemente causam doença em pacientes imunossuprimidos e naqueles que fazem tratamento prolongado com antibióticos [7]. O uso difundido e inadequado das drogas antifúngicas tem ocasionado um déficit nos bons resultados dos tratamentos contra candidemias. O principal fator para o fracasso da terapia é o aumento da resistência da *Candida sp* aos antifúngicos [1].

As plantas são de fácil acesso, possuem vários princípios ativos e são de menor custo para a população [14].

A Organização Mundial de Saúde preconiza o uso de plantas medicinais, sobretudo em países em desenvolvimento, nos programas de saúde pública.[13]

Os condimentos são de origem vegetal, sendo frequentemente utilizados para conferir sabor agradável aos alimentos, no entanto são ricos em óleos essenciais, que são misturas naturais complexas de metabólitos secundários voláteis, podendo ser isolados de plantas por vapor ou hidrodestilação [6,14] Alguns condimentos apresentam atividade antimicrobiana, que pode ajudar na conservação de alimentos [5]. Estudos têm demonstrado o efeito inibidor de condimentos no desenvolvimento de microrganismos deterioradores e patogênicos veiculados por alimentos. Existe também a perspectiva de substituir os aditivos sintéticos por conservantes naturais presentes nos condimentos [14]

Um grande número de óleos essenciais e seus constituintes têm sido investigados por suas propriedades contra algumas bactérias, fungos, vírus e protozoários. Sua atividade antimicrobiana é estritamente ligada a sua composição química e não tem sido relatada a resistência de bactérias e fungos aos constituintes dos óleos. [19]

O objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* a atividade de óleos essenciais de plantas utilizadas

na culinária frente a diferentes espécies de *Candida*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismos

Candida albicans ATCC[®] 10231, *Candida parapsilosis* ATCC[®] 22019 e *Candida krusei* ATCC[®] 6258. Amostras obtidas da micoteca do Hospital Maternidade Celso Pierro: *Candida albicans* (n^o 422792), *Candida albicans* (n^o 421888), *Candida glabrata* (n^o420996), *Candida krusei* (n^o423073). Foram mantidas em Sabouraud Dextrose Agar.

2.2 Amostras testadas

Foram utilizadas 7 plantas utilizadas na culinária: *Zingiber officinalis* (gengibre) e *Coriandrum sativum* (coentro), os quais foram obtidos frescos do Mercado Municipal de Campinas – SP; *Cominum cuminum* (cominho), *Crocus sativus* (açafrão), *Thymus vulgaris* (tomilho), e *Myristica fragrans* (noz moscada), sendo utilizados secos da marca Aroma de Tempero[®]; *Ocimum Basilicum* (manjeriçã) foi obtido o óleo essencial da empresa Linax Extração de Óleos Essenciais LTDA (Votuporanga - SP – Brasil), não sendo necessária a extração do mesmo.

2.3 Extração do Óleo Essencial

Os óleos essenciais foram obtidos pela técnica de arraste a vapor d'água, utilizando-se o aparelho de Clevenger por 3 horas. A fase aquosa foi extraída três vezes com diclorometano. A fase orgânica foi tratada com sulfato de sódio anidro, com finalidade de retirar a água remanescente, posteriormente foi filtrada e o solvente evaporado até secar utilizando-se rotavapor.[3]

Os óleos essenciais extraídos foram acondicionados em frascos âmbar, envoltos com papel alumínio e mantidos a -25^o C, até o momento do teste de susceptibilidade.

2.4 Testes de Difusão em Disco

O teste de difusão em disco foi realizado em duplicata de acordo com método preconizado pela CLSI M44-A, 2004 [11] com algumas modificações para óleo essencial.

O inóculo foi preparado com cultura de 24 horas dos microrganismos, sendo realizada suspensão em solução fisiológica estéril 0,85%, seguida por contagem em câmara de Neubauer para se obter 1 a 5 x 10⁶ células/mL, posteriormente foi semeado em placas (90mm) com meio de cultura Mueller Hinton, nas quais foram colocados discos de papel de filtro com 6,0mm de diâmetro da marca Cefar diagnóstica, sendo imediatamente impregnados

com 20µL de óleo essencial deixando à temperatura ambiente dentro do fluxo até secagem dos discos. A leitura e medida dos halos foram feitas após 48 horas de incubação à 35°C. Foi realizado controle de crescimento do microrganismo, utilizando-se placas sem disco com óleo e um controle negativo apenas com o meio e os discos para verificar se não havia contaminação.

2.5 Teste de Microdiluição

Foi realizado teste de microdiluição como preconizado pelo CLSI M27-A2, 2002 [12] para os óleos de *Thymus vulgaris* e *Ocimum basilicum*. O inóculo foi preparado com cultura de 24 hs dos microrganismos, sendo realizada suspensão em solução fisiológica estéril 0,85%, seguida por contagem em câmara de Neubauer. Esse procedimento fornece uma suspensão-padrão de levedura contendo 1 x 10⁵ a 5 X 10⁶. A suspensão de trabalho foi produzida fazendo-se uma diluição 1:100 seguida de uma diluição 1:20 da suspensão padrão com meio líquido RPMI 1640, resultando em concentração de 5,0 x 10² a 2,5 x 10³ células/mL. Os testes foram realizados em duplicata, sendo as soluções estoque dos óleos dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) 0,1% e diluídos em RPMI 1640 (Sigma) com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e tampão com 0,165 mol/L 3-morpholinopropanesulfonic acid (MOPS) em pH 7,0, obtendo-se a faixa de concentração de 7200µg/mL a 15380µg/mL e se não obtidos resultados nesse intervalo, foram testados na faixa de 3600 µg/mL a 36000 µg/mL; 180µL de cada diluição foram transferidos para os 10 primeiros orifícios da placa de microdiluição e em seguida 20µL do inóculo. Os 2 últimos orifícios foram preparados como controles positivos e negativos. Para validação dos testes foi utilizado o Fluconazol nas concentrações entre 128 e 0,25 µg/mL. As placas de microdiluição foram incubadas a 35°C, sendo realizadas leituras visuais após 24 e 48hs. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como menor concentração do óleo que não permitiu o crescimento visível do microrganismo. A concentração fungicida mínima (CFM) foi definida como a menor concentração do óleo que não permitiu o crescimento visível na subcultura do microrganismo, a qual foi obtida através da retirada de uma alíquota de 10µL dos orifícios onde não havia crescimento visível da levedura, sendo essa semeada em meio ágar Sabouraud-Dextrose e incubadas a 35°C por 48h.[8]

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foi pesquisada a atuação de diferentes óleos essenciais obtidos de plantas que são utilizadas como condimentos e, com exceção dos óleos de *Coriandrum sativum*, *Crocus sativus* e *Zingiber officinalis* todos os óleos tiveram boa atuação frente a diferentes espécies de *Candida* pela técnica de difusão em disco. *Crocus sativus* teve atuação somente para uma cepa de *C. albicans* e *Zingiber officinalis* para duas cepas de *C. albicans* e uma de *C. krusei* (Tabelas I e II).

Os óleos de *Cominum cyminum* e *Ocimum basilicum* foram os que tiveram melhor atuação frente a *C. glabrata* apresentando halos de inibição ≥ 150 mm. Para *C. parapsilosis* e *C. krusei*, o *Cominum cyminum* que apresentou maior atividade, obtendo-se halos de inibição de 90 mm, no entanto frente a diferentes cepas de *C. albicans* houve variação no tamanho dos halos de inibição para os diferentes óleos testados, demonstrando-se que existe variação susceptibilidade entre as linhagens de um mesmo microrganismo (Tabelas I e II). Nascimento *et al.* (2007) [10] também verificou variação na atividade antimicrobiana frente a diferentes cepas quando testou *Thymus vulgaris*.

Tabela I: Atividade antimicrobiana de óleo essencial de condimentos frente a diferentes cepas de *Candida* ATCC utilizando-se técnica de difusão em disco.

Óleos \ Cepas	Cepas		
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231*	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258*	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019*
<i>Crocus sativus</i>	0	0	0
<i>Coriandrum sativum</i>	0	0	0
<i>Cominum cyminum</i>	35	90	90
<i>Zingiber officinalis</i>	10	10	8
<i>Ocimum basilicum</i>	30	37	26
<i>Myristica fragrans</i>	10	21	12
<i>Thymus vulgaris</i>	40	38	38

*valores expressos em mm

Tabela II: Atividade antimicrobiana de óleo essencial de condimentos frente a diferentes cepas de *Candida* da micoteca do HMCP utilizando-se a técnica de difusão em disco

Óleos \ Cepas	Cepas			
	<i>Candida albicans</i> 422792*	<i>Candida albicans</i> 421888*	<i>Candida glabrata</i> 420996*	<i>Candida Krusei</i> 423073*
<i>Crocus sativus</i>	0	14	0	0
<i>Coriandrum sativum</i>	0	0	0	0
<i>Cominum cyminum</i>	18	34	≥ 150	110
<i>Zingiber officinalis</i>	0	0	11	0
<i>Ocimum basilicum</i>	50	33	≥ 150	41
<i>Myristica fragrans</i>	19	19	0	8
<i>Thymus vulgaris</i>	34	50	33	40

*valores expressos em mm

Foi realizado teste de diluição em caldo e determinação da concentração fungicida mínima para *Ocimum basilicum* e *Thymus vulgaris* frente às diferentes cepas testadas os resultados encontram-se na Tabela III.

Excetuando-se uma cepa de *C. albicans*, *Thymus vulgaris* evidenciou melhor atividade que o *Ocimum basilicum*, obtendo-se valores de CIMs e CFMs inferiores para todas as cepas testadas.

Sartoratto *et al.* (2004) [18] e Duarte *et al.* (2005) [3] compararam atividade antimicrobiana de óleos essenciais obtidos de plantas aromáticas brasileiras e obtiveram para os óleos de *Thymus vulgaris* e *Ocimum basilicum* CIMs de 2.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e > 2.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente para *Candida albicans* (ATCC 10231). Rahimifard, *et al.* (2008) [16] encontram para essa mesma cepa CIM de 0.30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *Thymus vulgaris*. Esses resultados foram menores do que os encontrados no presente estudo, no entanto as cepas de *C. albicans* foram diferentes.

Em estudo realizado por Pozatti *et al.* (2008) [15] com *Thymus vulgaris* encontrou-se CIMs de 400 a 3.200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para diferentes espécies de *Candida*, sendo para *C. albicans* 1.600 $\mu\text{g}/\text{mL}$; *C. glabrata* 1.400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e *C. krusei* 1.800 $\mu\text{g}/\text{m}$, sendo avaliados pela metodologia preconizada pela CLSI M27[12]. Essas CIMs foram menores do que as encontradas nessa pesquisa Essas CIMs foram menores do que as encontradas nessa pesquisa, mas as cepas utilizadas foram diferentes, como também a composi-

ção química de uma mesma espécie de planta pode variar dependendo das características genéticas da planta e de vários fatores que envolvem as condições de cultivo, local e armazenamento.[2,519]

Em estudo realizado por Pozatti *et al* (2008) [15] com *Ocimum basilicum* verificou-se que as CIMs foram consideradas insignificantes (teste Mann-Whitney valores inferiores a P 0.05), semelhante o que ocorreu no presente estudo em que as CIMs para diferentes óleos de *Candida* foram maiores que as encontradas para *Thymus vulgaris*.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que os óleos essenciais de *Thymus vulgaris* foi o efetivo contra as cepas de *Candida*. Estudos *in vivo* devem ser realizados para se verificar a utilização desse óleo na terapêutica.

Tabela III: Atividade antimicrobiana dos óleos frente as cepas de *Cândida*

Cepas	<i>Ocimum basilicum</i>		<i>Thymus vulgaris</i>	
	CIM*	CFM*	CIM*	CFM*
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	21600	25200	8.100	9900
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	25200	36000	8181	14400
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	18000	>36000	8181	>15380
<i>C. albicans</i> nº422791	>36000	>36000	>36000	>36000
<i>C. albicans</i> nº421888	>36000	>36000	11700	12762
<i>C. krusei</i> nº423071	>36000	>36000	9162	12762
<i>C. glabrata</i> nº420996	>36000	>36000	9162	28800

*valores expressos em µg/mL

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Pontifícia Universidade Católica de Campinas pela bolsa de Iniciação Científica FAPIC/Reitoria concedida; a minha orientadora Prof. Dr^a. Maria Magali S. R. Soares e à equipe do laboratório de Microbiologia da Puc-Campinas: Andréia Bucci, Ângela Maria de Oliveira e Gisele Andrade.

REFERÊNCIAS

[1] Castro, T.L., et. Al., (2006), Mecanismos de resistência da *Candida* a antifúngicos. *Infarma.*, vol. 18, p. 30-35.

[2] Costa, L.V.B., et al. (2009) Variação no rendimento e composição química do óleo essencial de folhas de atoveran (*Ocimum selloi* Benth.) inteiras e moídas sob condições de armazenamento. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, vol. 11, n.1, p.43-48 capturado online em 15/08/2009 de http://www.ibb.unesp.br/servicos/publicacoes/rbpm/pdf_v11_n1_2009/artigo8_p43-48.pdf

[3] Duarte, M.C.T., et al. (2005) Anti- *candida* activity of essential oils and extracts from native and exotic medicinal plants used in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, vol 97, p. 305-311

[4] Farmacopéia Brasileira. Determinação de óleos essenciais em drogas vegetais. 4 ed. São Paulo: Atheneu São Paulo LTDA., 1988. V.4.2.6.

[5] HOFFMANN, F.L; et al (1999). Detreminação da atividade antimicrobiana "in vitro" de quatro óleos essenciais de condimentos e especiarias. *B.CEPPA*, Curitiba, vol. 17, n. 1, p. 11-20, Capturado online em 15/08/09 de <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/alimentos/artic/e/view/13794/9403>>

[6] Kalemba, D., Kunicka A.(2003) Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Currents Medicinal Chemistry* vol.10 p. 813-829

[7] Lai C.C, et al (2008) Current of challenges in the management invasive fungal infections. *J Infect Chemother*; 14 (2):77-85

[8] Manohar, et al, (2001) H.G. Antifungal activities of organum oil against *Candida albicans*. *Mol Cell Biochem* ; vol.228 p.111-117

[9] Ministério da Saúde (2009) Capturado online em 12 jul 2009 de <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_teto.cfm?idtxt=24111

[10] Nascimento P.F.C; (2007)Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Rev. bras. Farmacogn*:17(1):108-113

[11] NCCLS.(2004) *Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline*. NCCLS document M44-A(ISBN 1-56238-532-1).

[12]NCCLS.(2002) *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2*. NCCLS, Villanova, Pennsylvania, Capturado em 20/02/2009 de http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas_publicacoes_terapia_antifung.pdf

[13] Nogueira, J. R., et. Al (2008) O. Atividade antimicrobiana in vitro de produtos vegetais em otite externa aguda. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.*, Fev 2008, vol.74, no.1, p.118-124. ISSN 0034-7299. Capturado online em 17/08/2009 de <

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-72992008000100019>

[14] Pereira, M.C; et al. (2006) Inibição do desenvolvimento fúngico através dos óleos essenciais de condimentos. *Ciência e Agrotecnologia*, v.30, n.4, Lavras/SP, capturado online em 16/08/2009 de <http://www.scielo.br/pdf/cagro/v30n4/v30n4a20.pdf>

[15] Pozzatti, P (2008); et. Al. In vitro activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. *Canadian Journal of Microbiology* vol. 54, p950, 2008.

[16] Rahimifard, N., et al (2008) Antifungal activity of the native essential oil of *thymus vulgaris* on *Candida albicans*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* from Iran *Journal of Pure and Applied Microbiology* vol.2 p. 343-346

[17] Ribeiro M.G.; et. Al. (2001) Dimetilsulfóxido – DMSO no Teste de Sensibilidade Microbiana *in vitro* em cepas de *Rhodococcus equi* isoladas de afecções pulmonares em potros, *Ciência Rural*, vol.31, n.5. capturado online em 17/08/2009 de <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v31n5/a26v31n5.pdf>>.

[18] Sartoratto, et al (2004) Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil, *Brazilian Journal of Microbiology*, vol.35, n.4, p. 275-280, capturado online em 16/08/2009 de <<http://www.scielo.br/pdf/bjm/v35n4/v35n4a01.pdf>>

[19] Sienkiewicz, M., Denys, A. (2008). Activity of essential oils in prevention and therapy of mycoses. *Pediatrics I Medycyna Rodzina* vol.4 p. 178-182.