

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare*

Renata Giongo Helal

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Centro de Ciências da Vida
re_helal@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: O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente às cepas padrão de *Candida albicans* ATCC[®] 90028, *Candida parapsilosis* ATCC[®] 22019 e *Candida krusei* ATCC[®] 6258, utilizando a técnica de microdiluição em caldo de acordo com as metodologias preconizadas pelo NCCLS A2, 2002. Foram analisados 2 lotes diferentes à partir de 10 amostras industrializadas de orégano. Os óleos essenciais foram extraídos pelo processo de destilação por arraste a vapor d'água, utilizando o aparelho Clevenger. De acordo com os resultados, a sensibilidade das leveduras ao óleo essencial testado evidenciou comportamento diferente de acordo com a marca e o lote das amostras testadas. Verificou-se também que os óleos essenciais de orégano obtidos das diferentes marcas tiveram atuação antimicrobiana frente às leveduras *Candida albicans* e *Candida krusei*, no entanto, a maioria não teve atuação para *Candida parapsilosis* nas concentrações testadas, demonstrando ser a mais resistente.

Palavras-chave: *Origanum vulgare*, atividade antifúngica *in vitro*, *Candida* spp.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde – Farmácia – FAPIC/Reitoria.

1. INTRODUÇÃO

As propriedades antimicrobianas de substâncias presentes em extratos e óleos essenciais produzidos pelas plantas como uma consequência do metabolismo secundário são reconhecidas empiricamente há séculos [1-2]. Nos últimos anos tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais com a finalidade de se obter novos compostos com propriedades terapêuticas, devido principalmente aos microrganismos que causam prejuízos à saúde hu-

mana estarem se mostrando resistentes à maioria dos antimicrobianos conhecidos [3].

Muitas pesquisas citam as propriedades antibacterianas e antifúngicas das especiarias *in natura*, seus óleos essenciais e seus extratos. Várias plantas usadas para aromatizar alimentos são apontadas por apresentarem atividade antimicrobiana [4]. Dentre as espécies avaliadas quanto à ação terapêutica, *Origanum vulgare*, conhecido popularmente por orégano é uma erva perene e aromática na forma de arbusto, amplamente utilizada na culinária. Esta erva é rica em óleo essencial, o qual tem sido estudado quanto à atividade antimicrobiana, para que possa ser utilizado para retardar ou inibir o crescimento de microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes [5-6].

As leveduras do gênero *Candida* têm grande importância pela alta frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano. Sua presença na microbiota humana propicia a ocorrência de infecções, principalmente devido aos fatores de virulência do fungo e a interação com pacientes hospitalizados com debilidade do sistema imunológico [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 [8].

As infecções por *Candida* mais susceptíveis as drogas estão gradativamente sendo substituídas por infecções causadas por cepas mais resistentes. Dentre as espécies de *Candida* mais susceptíveis estão a *C. albicans*, e entre as menos susceptíveis estão a *C. glabrata* e *C. krusei* [8].

Este estudo teve por objetivo avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial extraído de *Origanum vulgare* frente a leveduras do gênero *Candida*.

2. METODOLOGIA

2.1 Microrganismos

Foram utilizadas cepas padrão de *Candida albicans* ATCC[®] 90028, *Candida parapsilosis* ATCC[®] 22019 e *Candida krusei* ATCC[®] 6258. Estas cepas foram mantidas em Sabouraud Dextrose Agar e repicadas 24 horas antes do início de cada experimento, com a finalidade de garantir a pureza e viabilidade desses microrganismos.

2.2 Amostras testadas

Foram utilizados dois lotes diferentes a partir de dez amostras comerciais de *Origanum vulgare* L. (orégano): 1) 1Dafap's[®] (lote a 00003785, e b LLL7.2929); 2) Kisabor[®] (lote a 050 e b 01079); 3) Masterfoods[®] (lote a 706EMO7 e lote b L749CM09); 4) Kitano[®] (lote a 11A07 e b 19J07E) 5) PQ[®] (lote a 12501 e b 12006); 6) Aroma das Ervas[®] (lote a 011106 e b 011207); 7) Kodilar[®] (lote a 279 e b 296); 8) Penina[®] (lote a 1022L2 e b 1113L4); 9) BVS[®] (lote a 001/08 e b 01207); 10) Marcy[®] (lote a 10.07.2009 e b 08.01.2010).

2.3 Extração do Óleo Essencial

A extração do óleo essencial de orégano foi realizada por hidrodestilação utilizando-se o aparelho Clevenger, a partir de 40g de folhas secas da planta durante 3 horas. Em seguida, a fase aquosa foi extraída com diclorometano (3 x 50 mL) e a fase orgânica obtida foi tratada com sulfato de sódio anidro, filtrada sob algodão e o solvente foi evaporado em rotavapor [1, 9].

2.4 Testes de Suscetibilidade

A avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada de acordo com a metodologia preconizada pelo NCCLS M27-A2, 2002 [10]. O inóculo foi preparado por suspensão de cultura de 24hs da levedura em solução salina estéril a 0,85% e realizada contagem das células em câmara de Neubauer. A concentração final do inóculo na placa teste foi de $1,0 \times 10^3$ CFU/mL. As soluções estoque dos óleos essenciais foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) 0,1% e diluídas em RPMI 1640 com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio, e tampão com 0.165 mol/L 3-morpholinopropanesulfonic acid (MOPS) in pH 7.0, para obter concentrações que variaram de 8100 µg/mL a 505,8 µg/mL. De cada diluição foi transferido 180µL para os orifícios das dez primeiras fileiras da placa de microdiluição seguidos de 20µL do inóculo. Os dois últimos orifícios foram preparados como controles positivos e negativos. As

microplacas inoculadas foram incubadas a 35°, sendo realizada leitura a 24 e 48 horas. A CIM foi definida como a menor concentração do óleo essencial capaz de inibir o crescimento visível dos microrganismos. Para validação dos testes foi realizado controle de crescimento em DMSO 0,1% e teste de suscetibilidade com os antibióticos Anfotericina B, Fluconazol, Itraconazol e Cetoconazol.

A Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi determinada a partir dos orifícios da Placa de Microdiluição onde não houve crescimento fúngico visível. Foi retirada uma alíquota de 15 µL, semeando-a na superfície do meio Agar Sabouraud Dextrose. Após 48h de incubação a 35°C, definiu-se a concentração fungicida mínima como a menor concentração do óleo essencial em estudo capaz de causar a morte do microrganismo. [6].

2.5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados demonstraram que, com base nas CIMs, a faixa de suscetibilidade de *Candida albicans* frente a diferentes amostras de *Origanum vulgare* foi de 1.012,5 µg/mL a concentrações maiores que 8.100 µg/mL (Tabela 1).

O óleo essencial de orégano extraído da marca Kisabor[®] lote 050 foi o que apresentou menor CIM (1.012,5 µg/mL) frente a essa levedura e os que apresentaram maior CIM foram os das marcas PQ[®] lote 12501, BVS[®] lote 00108 e Marcy[®] validade 08/01/2010 (> 8.100 µg/mL) (Tabela 1).

Quanto a CFM, os resultados obtidos demonstraram que o óleo essencial de orégano obtido da marca Penina[®] lote 1022L2 foi o que apresentou menor CFM (3.600 µg/mL) e os que apresentaram maior CFM foram das marcas PQ[®], Aroma das Ervas[®], BVS[®] e Marcy[®] nos dois lotes testados (> 8.100 µg/mL) (Tabela 1).

A atividade do óleo essencial de orégano extraído das 10 amostras quando testadas frente a *Candida krusei* evidenciou suscetibilidade variável de 2.025 µg/mL a concentrações maiores que 8.100 µg/mL para CIM e de 4.050 µg/mL a concentrações maiores que 8.100 µg/mL para CFM (Tabela 1).

O óleo essencial de orégano extraído da marca Aroma das Ervas[®] lote 011207 foi o que apresentou menor CIM (2.025 µg/mL) e os óleos que demonstraram maior CIM foram das marcas PQ[®] lote 12501, Kodilar[®] lote 296 e os dois lotes da marca BVS[®] (> 8.100 µg/mL) (Tabela 1).

Tabela1. Suscetibilidade de *Candida spp* frente ao óleo essencial de *Origanum vulgare* (orégano) obtido de 20 amostras industrializadas.

Amostra/ Lote	Microrganismos					
	<i>C. albicans</i> ATCC 90028		<i>C. krusei</i> ATCC 62258		<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
1/a	2025	4500	3600	4050	> 8100	> 8100
1/b	2025	4500	4500	7200	> 8100	> 8100
2/a	1013	4500	3600	5400	> 8100	> 8100
2/b	2025	4050	3600	7200	> 8100	> 8100
3/a	2025	4050	3600	6300	> 8100	> 8100
3/b	2025	4050	4050	6300	> 8100	> 8100
4/a	3600	4050	4500	7200	> 8100	> 8100
4/b	3600	4500	3600	4500	> 8100	> 8100
5/a	> 8100	> 8100	> 8100	> 8100	8100	8100
5/b	8100	> 8100	8100	> 8100	8100	8100
6/a	4500	> 8100	4500	> 8100	6300	8100
6/b	3600	> 8100	2025	> 8100	5400	8100
7/a	6300	6300	8100	> 8100	> 8100	> 8100
7/b	5400	5400	> 8100	> 8100	> 8100	> 8100
8/a	3600	3600	5400	> 8100	5400	> 8100
8/b	5400	5400	8100	> 8100	8100	> 8100
9/a	> 8100	> 8100	> 8100	> 8100	> 8100	> 8100
9/b	8100	> 8100	> 8100	> 8100	> 8100	> 8100
10/a	6300	> 8100	6300	> 8100	6300	> 8100
10/b	> 8100	> 8100	8100	> 8100	8100	> 8100

Quanto a CFM, 60% dos lotes testados apresentaram CFM maior que 8.100 µg/mL. O óleo essencial de orégano extraído da marca Dafap's lote 00003785 foi o que apresentou menor CFM (4.050 µg/mL) (Tabela 1).

Com relação à atuação do óleo essencial de orégano frente a *Candida parapsilosis*, pôde-se observar que a maioria dos óleos essenciais extraídos das diferentes marcas não demonstraram atividade antifúngica nas concentrações testadas. Os óleos essenciais extraídos das marcas Aroma das Ervas® lote 011207

e Penina® lote 1022L2 foram os que apresentaram menor CIM (5.400 µg/mL) (Tabela 1).

Com relação à CFM, os resultados encontrados demonstram que a menor CFM foi obtida em apenas 20% dos lotes (PQ® e Aroma das Ervas®) testados, sendo esta a maior concentração testada no estudo (Tabela 1).

Os resultados do presente estudo demonstram que os óleos essenciais de orégano obtidos das diferentes marcas tiveram atuação antimicrobiana frente às leveduras *Candida albicans* e *Candida krusei*, no entanto, a maioria não teve atuação para *Candida parapsilosis* nas concentrações testadas, demonstrando ser a mais resistente (Tabelas 1).

Alguns estudos têm demonstrado a potencialidade antimicrobiana do óleo essencial de orégano utilizando diferentes técnicas [1,6,11], no entanto não foi encontrado estudo em que foi utilizada a técnica preconizada pela NCCLS.

SARTORATTO *et al.* (2004) compararam a atividade antimicrobiana de óleos essenciais obtidos de plantas aromáticas usadas no Brasil e concluíram que a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para o óleo essencial de orégano frente a levedura *Candida albicans* foi de 2.000 µg/mL, similar à obtida no presente estudo, no entanto, MONOHAR *et al.*, (2001) e TAMPIERI *et al.*, (2005) encontram valores de CIMs menores 250 µg/mL e 500 ppm, respectivamente. Essas diferenças podem ser decorrentes das diferenças nas metodologias e meios de cultura utilizados, como também heterogeneidade dos óleos essenciais. No estudo realizado por MONOHAR *et al.*, (2001) foi utilizada a técnica microdiluição em caldo com meio Sabouraud Dextrose e na pesquisa de TAMPIERI *et al.*, (2005) foi utilizado o método de Suscetibilidade Antifúngica em Ágar Semissólido (SAAS) também com meio Sabouraud Dextrose, mas acrescentado de Bacto Agar 0,5% e tween 20 0,1%, em nenhum dos casos foi usado o RPMI, o qual é preconizado pela NCCLS.

A suscetibilidade das leveduras frente ao óleo essencial de orégano testadas no presente estudo evidenciou comportamento diferente de acordo com a marca e o lote das amostras testadas. Essa variação pode ter ocorrido devido a composição química, como também as propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais que dependem de vários fatores de ordens climáticas, sazonais, geográficas, bem como pelas condições de cultivo, estágio de desenvolvimento, período de colheita do vegetal e técnica de obtenção do produto derivado. O ambiente no qual o vegetal se desenvolve e o tipo de cultivo também influem sobre a composição química dos óleos voláteis.

A temperatura, a umidade relativa, a duração total de exposição ao sol e o regime de ventos exercem uma influência direta [12].

Além desses fatores, os óleos voláteis apresentam frequentemente problemas de qualidade, que podem ter origem na variabilidade da sua composição, na adulteração, falsificação ou, ainda, na identificação incorreta do produto e sua origem [12].

Com base no presente estudo pôde-se concluir que o óleo essencial de *Origanum vulgare* apresentou melhor atividade antimicrobiana frente às leveduras *Candida albicans* e *Candida krusei*.

5. AGRADECIMENTOS

Agradeço à Pontifícia Universidade Católica de Campinas pela bolsa de Iniciação Científica FAPIC/Reitoria concedida; a minha orientadora Prof. Dr^a. Maria Magali Stelato, a professora Dr^a. Angelica Zaninelli Schreiber; à equipe do laboratório de Microbiologia da Puc-Campinas e à equipe do laboratório de Microbiologia da UNICAMP, em especial a Luzia Lyra.

6. REFERÊNCIAS

- [1] Sartoratto, A., et al. (2004), Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* vol. 35, p. 275-280.
- [2] DEANS, S.G. et al. (1989), Biological activity of plant volatile oils and their constituents. *Planta Med* vol.55 p. 588.
- [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] Cunico, M.M., et al. (2004), Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol14, p. 97-103.
- [5] Souza, E.L., et al. (2005), Orégano (*Origanum vulgare* L., Lamiaceae): Uma especiaria como potencial fonte de compostos antimicrobianos. *Higiene Alimentar*, vol. 132, p. 40-45.
- [6] Manohar, V., et al. (2001), Antifungal activities of organum oil against *Candida albicans*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 228, p. 111-117.
- [7] Ribeiro, E.L., et al. (2004) Aspectos das Leveduras de *Candida* Vinculadas as Infecções Nosocomiais. *NewsLab*, vol. 64, p. 106-128.

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

[9] FARMACOPÉIA BRASILEIRA. (1988) Determinação de óleos essenciais em drogas vegetais. 4^o ed, Atheneu, São Paulo vol. 4.2.6.

[10] NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2. NCCLS, Villanova, Pennsylvania.

[11] Tampieri, M., et al (2005). The inhibition of *Candida Albicans* by selected essential oils an their major compnents. *Mycopathologia*, n. 159, p.339-345.

[12] Simões, C.M.O.S., et al., (2004) Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 474-479.