

POTENCIAL ANTIFÚNGICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ALECRIM E ORÉGANO FRENTE A LEVEDURAS

WALLER, Stefanie Bressan¹; SANTIN, Rosema²; CLEFF, Marlete Brum³, MELLO, João Roberto Braga⁴; MEIRELES, Mário Carlos Araújo⁵

¹Graduanda em Medicina Veterinária – UFPel Bolsista PIBIC/CNPq waller.stefanie@yahoo.com.br

²Doutoranda – PPG em Ciências Veterinárias – UFRGS

³Prof^o Adjunto – Departamento de Clínicas Veterinária – UFPel

⁴Prof^o Adjunto – Departamento de Farmacologia – Instituto de Ciências Básicas da Saúde – UFRGS

⁵Prof^o Associado – Departamento de Veterinária Preventiva – UFPel

1 INTRODUÇÃO

Devido à aproximação cada vez maior do proprietário com seu animal de estimação, a preocupação com a saúde oral em pequenos animais vem ganhando importância. A cavidade oral de animais e de humanos abriga grande variedade de leveduras e bactérias bastante complexas e diversificadas. Conhecer esta microbiota é de fundamental importância em odontologia, pois estes microrganismos são responsáveis por diversas afecções na cavidade oral (TRABULSI & SAMPAIO, 2005). O controle das infecções microbianas é realizado de forma empírica há séculos através do uso de óleos essenciais de plantas que contêm propriedades antimicrobianas (SARTORATTO et al., 2004), sendo que os vegetais da família Lamiaceae têm servido de objeto de estudo de pesquisadores. Além disso, a busca constante por substâncias com potencial antimicrobiano se dá pela crescente resistência dos microrganismos aos fármacos atuais (DUARTE et al., 2005). Este trabalho objetivou avaliar a suscetibilidade *in vitro* de leveduras isoladas da cavidade oral de fêmeas caninas aos óleos essenciais de *Rosmarinnus officinalis* (alecrim) e *Origanum vulgare* (orégano).

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Para o estudo da ação antifúngica dos óleos essenciais, as partes aéreas do alecrim foram colhidas na cidade de Pelotas – RS, sendo submetido à secagem; e o material vegetal do orégano foi adquirido de distribuidor comercial de origem peruana. Ambos os produtos foram submetidos à hidrosdestilação em aparelho de Clevenger por 4h para obtenção dos óleos essenciais no Instituto de Química e Geociências da UFPel.

Foram analisadas 18 leveduras isoladas da cavidade oral, sendo elas: *Candida albicans* (n=3), *C. catenulata* (n=3), *C. famata* (n=2), *C. parapsilosis* (n=1), *C. guilliermondii* (n=1) e *Trichosporon asahii* (n=8). Para a realização do teste de suscetibilidade *in vitro* foi utilizada a técnica de Microdiluição em Caldo de acordo com o documento M27A3 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) com modificações para óleos essenciais. Os óleos essenciais de alecrim e orégano foram utilizados nas concentrações 3 a 0,09%.

Os inóculos foram preparados a partir de colônias jovens com crescimento de 24h em ágar Sabouraud dextrose acrescido de Cloranfenicol, sendo suspensos posteriormente em solução salina estéril, homogeneizados e ajustados através do espectrofotômetro numa transmitância de 70-76%. A partir desta solução foi realizada uma diluição de 1:100 em solução salina estéril e, em seguida, outra diluição de 1:20 em meio RPMI-1640. Os óleos essenciais foram diluídos em RPMI-

1640 acrescido de 10µL de tween 80 para facilitar a homogeneização dos óleos essenciais ao meio de cultura.

Para o teste de microdiluição em caldo, todos os poços da microplaca foram previamente preenchidos com 100µL de meio RPMI-1640, sendo adicionado 100µL do óleo essencial nos poços correspondente à coluna de maior concentração do produto, a qual foi feita a diluição de forma sucessiva. Posteriormente, 100µL do inóculo ajustado em meio RPMI-1640 foi transferido a todos os poços, exceto na coluna correspondente ao controle negativo, que por sua vez recebeu a adição de 100µL de RPMI-1640. O teste *in vitro* foi realizado em duplicata e as microplacas foram incubadas a 35°C por 72h para leitura da concentração inibitória mínima (CIM). Para obtenção dos resultados, a concentração fungicida mínima (CFM) foi realizada transferindo-se 10µL de cada concentração dos óleos em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose acrescido de Cloranfenicol e incubados a 36°C por 48 h.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de CIM e CFM variam de 0,19 a 0,37% para orégano e 0,37 a >3% para alecrim, sendo que 16 isolados de leveduras apresentaram valores de CIM e CFM iguais para os dois óleos estudados. Entretanto, um isolado de *C. albicans* e outro de *T. asahii* apresentaram valores de CIM e CFM diferentes, sendo 0,37 e 0,75%, respectivamente para ambos. Os resultados demonstram que a concentração fungicida dos óleos é maior que a concentração inibitória mínima (Tab.1).

Tabela 1 – Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos óleos essenciais de *R. officinalis* e *O. vulgare* contra 18 leveduras isoladas da cavidade oral de fêmeas caninas.

Leveduras Isoladas	<i>R. officinalis</i> (Alecrim) 3 a 0,09%		<i>O. vulgare</i> (Orégano) 3 a 0,09%	
	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>Candida albicans</i>	1,5	1,5	0,75	0,75
<i>Candida albicans</i>	>3	>3	0,37	0,75
<i>Candida albicans</i>	>3	>3	0,37	0,37
<i>Candida catenulata</i>	0,75	0,75	0,19	0,19
<i>Candida catenulata</i>	1,5	1,5	0,37	0,37
<i>Candida catenulata</i>	>3	>3	0,37	0,37
<i>Candida famata</i>	3	3	0,75	0,75
<i>Candida famata</i>	>3	>3	0,37	0,37
<i>Candida parapsilosis</i>	>3	>3	0,37	0,37
<i>Candida guilliermondii</i>	0,75	0,75	0,37	0,37
<i>Trichosporon asahii</i>	0,37	0,37	0,37	0,37
<i>Trichosporon asahii</i>	1,5	1,5	0,37	0,37
<i>Trichosporon asahii</i>	1,5	1,5	0,75	0,75
<i>Trichosporon asahii</i>	1,5	1,5	0,75	0,75
<i>Trichosporon asahii</i>	1,5	1,5	0,75	0,75
<i>Trichosporon asahii</i>	1,5	1,5	0,37	0,75
<i>Trichosporon asahii</i>	3	3	0,37	0,37
<i>Trichosporon asahii</i>	>3	>3	0,75	0,75

A cavidade oral das fêmeas caninas apresenta leveduras na microbiota local, sendo alguns isolados suscetíveis à ação dos óleos essenciais de alecrim e de orégano nas concentrações testadas, evidenciando um possível controle destas leveduras com o uso destes fitoterápicos, principalmente nos casos de surgimento

de resistência às drogas antifúngicas. Entretanto, dois isolados de *C. albicans* e um de *C. catenulata*, *C. famata*, *C. parapsilosis* e *T. asahii* não foram inibidos nas concentrações testadas do óleo essencial de alecrim. Possivelmente, é preciso de uma concentração superior a 3% deste óleo para obtenção da atividade fungistática/fungicida. Neste sentido, já foi descrito a atividade antimicrobiana deste óleo essencial na concentração de 8% em isolados de bactérias e leveduras (LIMA et al., 2006).

Os testes *in vitro* demonstraram que o óleo essencial de orégano apresentou melhor resultado para as leveduras em relação ao alecrim, uma vez que menores concentrações do óleo de orégano apresentaram atividade fungicida. Este resultado está de acordo com o estudo feito por Cleff et al. (2007), no qual o óleo essencial de orégano apresentou melhores resultados quando comparado ao alecrim. Em um estudo feito por Cleff et al. (2010a), a média da CIM obtida do óleo essencial de orégano frente à *C. albicans* foi 0,3%. Entretanto, a média obtida em nosso trabalho foi 0,5%. Em outro estudo desenvolvido por Cleff et al., (2010b), foi demonstrado que os valores de CIM e CFM para cepas padrões de *C. albicans* foi $2.97 \mu\text{L mL}^{-1}$ e $3.54 \mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente, e para cepas de *C. não-albicans* foi $2.10 \mu\text{L mL}^{-1}$ e $2.97 \mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente. Os resultados corroboram com os nossos, evidenciando que o óleo essencial de orégano tem ação contra cepas fúngicas de *Candida* sp. A ação antimicrobiana do orégano se dá pela presença de timol/carvacrol associado com a alta concentração de 4-terpineol no óleo, aos quais atuam, induzindo a deformações na membrana celular, alterando a permeabilidade (LAMBERT et al., 2001, CLEFF et al. (2010a).

Diversos estudos demonstraram a potencialidade antimicrobiana dos óleos essenciais, utilizando diferentes técnicas adaptadas de antifungigrama, como difusão em ágar, difusão em disco e a técnica de microdiluição em caldo, a qual tem sido utilizada com bons resultados (LAMBERT et al., 2001; ARANGO et al., 2004). Segundo Cleff et al., (2007), a concentração inibitória mínima do óleo essencial de alecrim contra diferentes cepas de *C. albicans* variou de 2,5 a 10 $\mu\text{L/mL}$, sendo *C. parapsilosis* inibida na concentração de 1,25 $\mu\text{L/mL}$. Tais resultados diferem do nosso estudo, pois as leveduras apresentaram resistência às concentrações testadas. Entretanto, para Lima et al., (2006), o óleo essencial de alecrim mostrou baixa efetividade antifúngica, provavelmente pela diferente metodologia empregada pelos autores, a qual utilizaram o método de difusão em meio sólido.

Entretanto, na literatura consultada não foram encontrados relatos de suscetibilidade da levedura *T. asahii* aos óleos essenciais de alecrim e orégano. Silva et al., (2008) relataram que já há casos de resistência antifúngica de *T. asahii* isolado de pacientes imunocomprometidos às drogas 5-fluorocitocina, azóis e anfotericina B.

4 CONCLUSÃO

Os testes *in vitro* demonstraram que os óleos essenciais de alecrim e orégano possuem ação antifúngica frente a leveduras do gênero *Candida* e *Trichosporon*, representando uma alternativa no tratamento destas micoses.

5 REFERÊNCIAS

ARANGO, A. C. M.; SANCHÉZ, J. G. B.; GALVIS, L. A. B. Productos naturales con actividad antimicótica. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 17, p. 325-331, 2004.

CLEFF, M. B.; FONSECA, A. O.; SANTIN, R.; NASCENTE, P.; SCHUCH, L. F. D.; RODRIGUES, M. R.; MELLO, J. R. B.; MEIRELES, M. C. A. *Origanum vulgare* X *Rosmarinus officinalis*: avaliação *in vitro* frente a diferentes espécies de *Candida*. In: **Anais do XVI Congresso de Iniciação Científica da UFPel**, Pelotas, 2007.

CLEFF, M. B.; MEINERZ, A. R.; FARIA, R. O.; XAVIER, M. O.; SANTIN, R.; NASCENTE, P. S.; RODRIGUES, M. R.; MEIRELES, M. C. A. Atividade inibitória do óleo essencial do orégano em fungos de importância médica e veterinária. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.5, p.1291-1294, 2010a.

CLEFF, M. B.; MEINERZ, A. R.; XAVIER, M. O.; SCHUCH, L. F.; MEIRELES, M. C. A.; RODRIGUES, M. R. A.; MELLO, J. R. B. *In vitro* activity of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.116-123, 2010b.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA G. M.; SARTORATTO A.; REHDER V. L. G.; MACHADO A. L. M.; DELARMELINA, C. Anti-*Candida* activity of essential oils and extracts from native and exotic medicinal plants used in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p.305-311, 2005.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of orégano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Application Microbiology**, v. 91, p. 453-462, 2001.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

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**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.

SILVA, R. B. O.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MATSUMOTO, M. T.; BAEZA, L. C.; BENADUCCI, T.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Diversidade genética e suscetibilidade a antifúngicos de *Trichosporon asahii* isolado de pacientes de Unidades de Terapia Intensiva. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 585-592, 2008.

TRABULSI, L. R. & SAMPAIO, M. C. Microbiota ou Flora Normal do Corpo Humano. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM. **Microbiologia**, 4ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 12, p. 101-109.