

Comunicação

[Communication]

Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária

[Inhibitory activity of oregano essential oil against important fungus in veterinary]

M. B. Cleff¹, A.R. Meinerz², R.O. Faria², M.O. Xavier¹, R. Santin², P.S. Nascente²,
M.R. Rodrigues³, M.C.A. Meireles¹

¹Faculdade Veterinária - UFPel – Pelotas, RS

²Aluno de pós-graduação - FV-UFRGS – Porto Alegre, RS

³Instituto de Química, UFPel – Pelotas, RS

A crescente importância clínica atribuída às micoses em animais domésticos (Meinerz et al., 2007; Prestes et al., 2008), aliada às dificuldades representadas pelo tempo de administração, toxicidade e alto custo dos antifúngicos, tem impulsionado a realização de pesquisas na tentativa de se obter outras opções terapêuticas (Chami et al., 2004; Giordani et al., 2004). Nesse contexto, os extratos vegetais vêm ganhando espaço no cotidiano veterinário (Carmo et al., 2008; Prestes et al., 2008; Rusenova e Parvanov, 2009; Cleff et al., 2010). Assim, o estudo teve como objetivos avaliar a ação do óleo essencial do orégano (*Origanum vulgare*) em isolados fúngicos de importância na clínica veterinária, assim como analisar os constituintes químicos do óleo testado.

Utilizaram-se dois isolados humanos e 25 isolados clínicos de animais: *Candida albicans* (n=8); *Sporothrix schenckii* (n=7); *Malassezia pachydermatis* (n=8); *A. flavus* (n=2) e *A. fumigatus* (n=2). O óleo foi extraído por hidrodestilação em Clevenger e analisado por cromatografia em equipamento GC/FID (Schimadzu-17 A), nas seguintes condições: 40°C – 2°C/min; 145°C – 10°C/min; 280°C – 10 min; Td = 280°C; Tinj = 280°C; T col = 40°C e split = 1:50, sendo este comparado com os tempos de retenção de padrões terpênicos (Rodrigues et al., 2004).

A técnica de microdiluição em caldo foi a utilizada (NCCLSM27-A2 e M3). Os inóculos

fúngicos foram ajustados em 1-5x10⁶UFC/mL para as leveduras e *S. schenckii*, e ajustados em 5x10⁴UFC/mL para *Aspergillus*. O óleo foi submetido a nove diluições (2,0 a 0,004%) em RPMI 1640 e adicionado de Tween 80 (0,01%); para *M. pachydermatis*, utilizou-se Sabouraud líquido. As microplacas foram incubadas a 37°C por 48h e por 72-96h para os isolados de *Aspergillus*. A leitura da CIM correspondeu à menor concentração do óleo capaz de inibir o crescimento fúngico.

A análise cromatográfica identificou 34 constituintes, sendo 4-terpineol (41.17), timol (21.95), gamaterpinemo (5.91), alfaterpineol (4.98), carvacrol (4.71), betacariofileno (3.22) e metilcarvacrol (3.04), aqueles em maiores concentrações (Fig. 1). A literatura cita que fenóis, como carvacrol, timol, gamaterpeno e p-cimeno, representam 70,2% a 98% dos compostos ativos do óleo de *O. vulgare* (Rodrigues et al., 2004).

Dentre os fungos estudados, *M. pachydermatis*, *A. flavus* e *A. fumigatus* apresentaram maior sensibilidade ao óleo de orégano (Tab. 1; Fig. 2), concordando com outros autores, que obtiveram CIM do óleo entre 0,06% e 0,25% para *M. pachydermatis* (Prestes et al., 2008; Rusenova e Parvanov, 2009), enquanto Carmo et al. (2008) observaram atividade do orégano anti-*Aspergillus* com CIM entre 20 e 80µL/mL.

Recebido em 27 de novembro de 2009

Aceito em 10 de setembro de 2010

E-mail: emebrium@bol.com.br

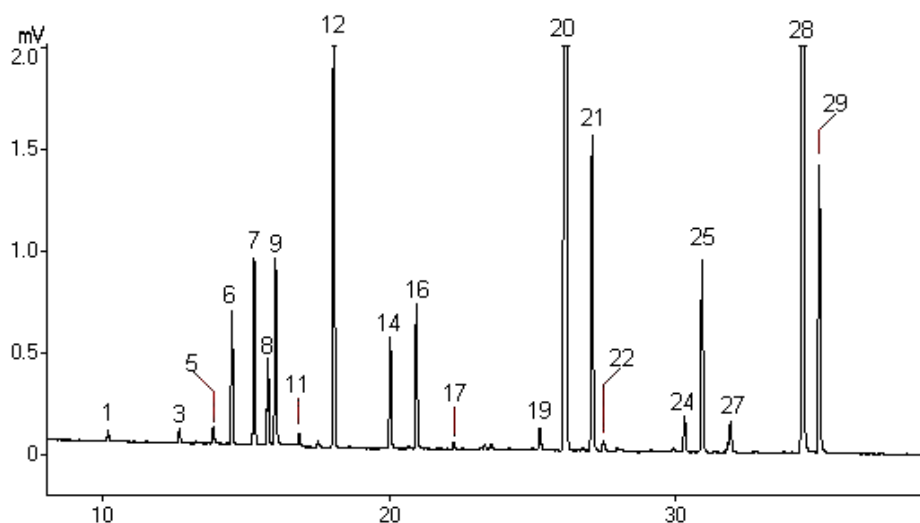


Figura 1. Cromatograma correspondente a amostra do óleo essencial do orégano, representando os principais constituintes, p=pico: α -tujeno (p1), sabineno (p3), mirceno (p5), α -felandreno (p6), α -terpineno (p7), p-cimeno (p8), limoneno (p9), cis/trans β -cimeno (p11), gamaterpinemo (p12), terpinoleno (p14), linalol (p16), trans-*p*-mentenol (p17), borneol (p19), 4-terpineol (p20), α -terpineol (p21), transpiperitol (p22), éter de metil timol (p24), éter de metilcarvacrol (p25), geraniol/nerol (p27), timol (p28) e carvacrol (p29). *Compostos identificados por comparação com o tempo de retenção dos padrões.

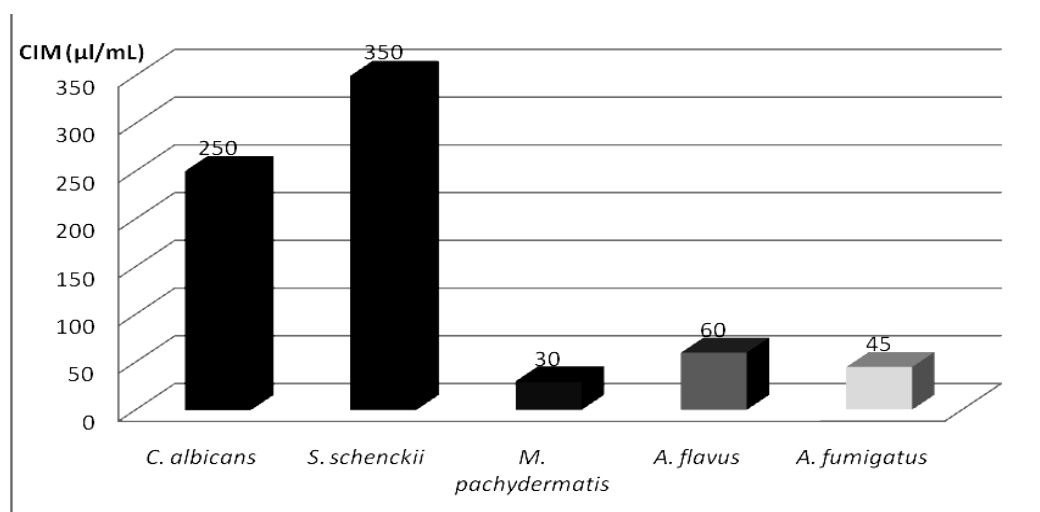


Figura 2. Representação gráfica dos valores médios de CIM do óleo essencial do *Origanum vulgare* (orégano) para diferentes espécies de fungos isolados de animais e do ambiente na região sul do Rio Grande do Sul.

A CIM para *C. albicans* e *S. schenckii* foi, em média, 0,3% (Tab. 1; Fig. 2), resultado satisfatório, já que estes agentes apresentam fatores de virulência e de resistência reconhecidos e são considerados de importância em saúde pública (Chami et al., 2004; Meinerz et al., 2007; Cleff et al., 2010). Outros autores avaliaram compostos isolados do óleo em *C.*

albicans e obtiveram CIM de 6,5mM para carvacrol e 12mM para eugenol (Chami et al., 2004). Em estudo prévio realizado por Cleff et al. (2010), ao utilizarem óleo de *O. vulgare* com alta concentração de 4-terpineol e proporções equilibradas de timol e carvacrol, demonstrou-se MIC de 2,72 μ g/mL⁻¹.

Atividade inibitória do óleo...

Tabela 1. Valores de concentração inibitória mínima para o óleo essencial do *Origanum vulgare* (%v/v) em espécies fúngicas isoladas de animais, humano e ambiente

Isolados	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	0,007	0,003	0,001
01. <i>C. albicans</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
02. <i>C. albicans</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
03. <i>C. albicans</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
04. <i>C. albicans</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
05. <i>C. albicans</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
06. <i>C. albicans</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
07. <i>C. albicans</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
08. <i>C. albicans</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
09. <i>S. schenckii</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
10. <i>S. schenckii</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
11. <i>S. schenckii</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
12. <i>S. schenckii</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
13. <i>S. schenckii</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
14. <i>S. schenckii</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
15. <i>S. schenckii</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
16. <i>M. pachydermatis</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
17. <i>M. pachydermatis</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
18. <i>M. pachydermatis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
19. <i>M. pachydermatis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
20. <i>M. pachydermatis</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
21. <i>M. pachydermatis</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
22. <i>M. pachydermatis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
23. <i>M. pachydermatis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
24. <i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
25. <i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
26. <i>A. fumigatus</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
27. <i>A. fumigatus</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

Sinal (-) representa inibição do crescimento fúngico, sendo considerada a CIM; sinal (+) representa crescimento fúngico. Números indicam a procedência do isolado: 1 a 6- mucosa vaginal de fêmeas caninas, 7- tegumento cutâneo de cão, 8- tegumento cutâneo de macaco; 9 a 13- esporotricose felina, 14 e 15- esporotricose humana, 16 a 23- meato acústico externo canino, 24 e 25- ambiente, 26 e 27- aspergilose pulmonar em pinguins.

Os valores de CIM podem ter sido influenciados pela razão molar dos compostos timol/carvacrol (4:1) associados à alta concentração de 4-terpineol no óleo utilizado, já que estes têm sido descritos como responsáveis pela ação antimicrobiana do orégano (Lambert et al., 2001; Ultee et al., 2002; Chami et al., 2004). Estes compostos atuam induzindo deformações na membrana celular, alterando a permeabilidade. Além disso, é possível que núcleos aromáticos, contendo um grupo polar, possam fazer ligações de hidrogênio com os sítios ativos de enzimas

microbianas alvo, o que favoreceria a atividade antimicrobiana (Lambert et al., 2001; Ultee et al., 2002).

Os resultados *in vitro* permitem concluir que o óleo do *O. vulgare* apresenta ação antifúngica, porém é importante realizar análises *in vivo* que confirmem a relação destes resultados, avançando na busca de alternativas terapêuticas aos antifúngicos.

Palavras-chave: fungos, óleo essencial, orégano

ABSTRACT

The in vitro activity of *Origanum vulgare* essential oil against fungal isolates was evaluated. A total of 27 clinical isolates were used, including: *C. albicans*, *S. schenckii*, *M. pachydermatis*, *Aspergillus flavus*, and *A. fumigatus*. Microdilution in broth technique (NCCLS M27-A2 and M-38) was used and susceptibility was expressed as Minimum Inhibitory Concentration (MIC). Essential oil was obtained by hydrodistillation in Clevenger and analyzed by gas chromatography, showing the presence of 4-terpineol, alpha-terpineol, 4-terpinene, thymol and carvacrol, as the main compounds. *Origanum* oil MIC for *C. albicans* varied from 125 to 500 µL/mL; for *S. schenckii*, from 250 to 500 µL/mL; for *M. pachydermatis*, from 15 to 30 µL/mL; and for *Aspergillus*, from 30 to 60 µL/mL. Isolates sensitivity showed to the *origanum* oil stimulates the accomplishment of new studies, including in vivo tests, contributing to the search of alternative treatments to mycosis.

Keywords: fungal, essential oil, *origanum*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARMO, E.S.; LIMA, E.O.; SOUZA, E.L. The potential of *origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. *Braz. J. Microbiol.*, v.39, p.362-367, 2008.
- CHAMI, N.; CHAMI, F.; BENNIS, S. et al. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *Braz. J. Infec. Dis.*, v.8, p.217-226, 2004.
- CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.M.; XAVIER, M.O. et al. In vitro activity of *Origanum vulgare* essential oil against *candida* species. *Braz. J. Microbiol.*, v.41, p.116-123, 2010.
- GIORDANI, R.; REGLI, P.; KALOUSTIAN, J. et al. Antifungal effect of various essential oils against *C. albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytot. Res.*, v.18, p.990-995, 2004.
- LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.*, v.91, p.453-462, 2001.
- MEINERZ, A.R.M.; CLEFF, M.B.; NASCENTE, P.S. et al. Esporotricose felina, micose de interesse em saúde pública. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.29, p.174-176, 2007.
- PRESTES, L.S.; SCHUCH, L.F.D.; MEIRELES, M.C.A. et al. Actividad de extractos de orégano y tomillo frente a microorganismos asociados con otitis externa. *Rev. Cubana Plant. Medic.*, v.13, p.4-8, 2008.
- RODRIGUES, M.R.A.; KRAUSE, L.C.; CARAMÃO, E.B. et al. Chemical composition and extraction yield of the extract of *Origanum vulgare* obtained from sub- and supercritical CO₂. *J. Agric. Food Chem.*, v.52, p.3042-3047, 2004.
- RUSENOVA, N.; PARVANOV, P. Antimicrobial activities of twelve essential oils against microorganisms of veterinary importance. *Trakia J. Sci.*, v.7, p.37-43, 2009.
- ULTEE, A.; BENNINK, M.H.J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.68, p.1561-1568, 2002.