

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *ORIGANUM VULGARE* LIVRE E COMPLEXADO COM CICLODEXTRINAS.

Beatriz de Oliveira Mazzotti (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Juliana Harumi Miyoshi (Co-orientadora), Graciete Matioli (Orientadora), e-mail: gmatioli@uem.br.
Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde-Departamento de Farmácia/Maringá, PR.

Área e sub-área do conhecimento: Microbiologia aplicada

Palavras-chave: óleo essencial, atividade antimicrobiana, ciclodextrina.

Resumo:

Origanum vulgare, conhecido popularmente como orégano, é uma planta medicinal amplamente empregada como condimento alimentício, mas, também pode ser utilizada na medicina tradicional, podendo atuar como um poderoso antimicrobiano e antifúngico. O óleo é extraído das pequenas folhas da planta e pode atuar diretamente na membrana plasmática dos microrganismos. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana e antifúngica do óleo essencial extraído do *Origanum vulgare*. Também foi pesquisada a possibilidade de melhorar a atividade do óleo quando o mesmo fosse complexado com ciclodextrina pelos métodos de amassamento, co-precipitação e mistura física. Para realização dos ensaios microbiológicos foram utilizadas as metodologias de determinação da concentração inibitória mínima e da concentração bactericida/fungicida mínima para o óleo essencial livre e para os complexos formados. O óleo essencial livre apresentou uma melhor atividade antimicrobiana quando comparado com os complexos. O resultado foi promissor, pois o óleo essencial de orégano pode superar a capacidade antimicrobiana de outros óleos, com uma quantidade menor e com um preço mais acessível.

Introdução

Nos últimos anos a popularização dos óleos essenciais (OE) tem se tornado cada vez mais intensa e são gradativamente empregados pela indústria farmacêutica, devido à presença de compostos que têm ação antibacteriana e antifúngica, como também em indústrias de alimentos, afim de que os óleos sejam alternativas naturais, baratas e tecnológicas para reduzir ou eliminar microrganismos de seus produtos. Além disso, a atividade antimicrobiana dos OE também vem sendo estudada para o desenvolvimento de sanitizantes e produtos de limpeza e higiene (CARVALHO *et al*, 2017).

O OE de *Origanum vulgare* possui uma grande quantidade de bioativos benéficos para a saúde. Isto já vem sendo documentado de longa data e demonstra bons resultados em relação a capacidade inibitória contra várias bactérias Gram positivas e Gram negativas (DELAQUIS *et al*, 2002).

Por possuírem baixa solubilidade, os OEs acabam tendo baixa biodisponibilidade, assim como a alta sensibilidade aos fatores externos, como a luz, calor e temperatura (SAGIRI, ANIS e PAL, 2016). A microencapsulação, utilizando como agente complexante as ciclodextrinas (CDs), facilita os OEs a se solubilizarem em meios aquosos, aumentando sua estabilidade, com preservação da sua atividade antioxidante e biodisponibilidade (SAGIRI, ANIS e PAL, 2016).

Considerando a grande aplicabilidade dos OEs e a necessidade de estabilizar e solubilizar os mesmos para possibilitar sua maior utilização, a presente pesquisa teve por objetivo avaliar os efeitos da complexação na atividade antimicrobiana do OE e complexado com a beta-CD. Os resultados da pesquisa possibilitarão a utilização do OE nos diversos setores industriais, como indústria farmacêutica e alimentícia.

Materiais e Métodos

A atividade antimicrobiana foi avaliada com a utilização dos seguintes microrganismos: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*. Foi utilizado o óleo em sua forma livre e complexado com beta-CD pelos métodos de amassamento, co-precipitação e mistura física.

- Formação do complexo

As metodologias utilizadas para a formação do complexo foram citadas por Galvão e colaboradores (2015). Os complexos foram preparados pelos métodos de mistura física, amassamento e co-precipitação. A proporção de OE e beta-CD foi escolhida com base no composto majoritário de cada óleo (PINTO et al., 2005).

- Padronização da suspensão microbiana

Para que os microrganismos fossem utilizados, seguindo a referência da Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) M07-A9 do CLSI (2012) e M27-A3 do CLSI (2008), foi necessária a realização da padronização da suspensão microbiana. As bactérias foram semeadas em Caldo Müller-Hinton (CMH) e incubadas durante 24 h e as leveduras semeadas em Caldo Sabouraud dextrose e incubadas por 48 h. Após o crescimento, a suspensão microbiana foi diluída em solução salina estéril (0,9% NaCl) até atingir a turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland e, em seguida, diluídos 1:10 em salina estéril.

- Concentração inibitória mínima (CIM) – Microdiluição em caldo

Preparou-se soluções contendo 8 mg/mL do OE livre utilizando 50 µL de Tween 80 para solubilizar, e o solvente CMH. Para as bactérias, um volume de 100 µL de CMH foi adicionado em cada poço da placa para cultivo de células de 96 poços. Posteriormente, foi adicionado 100 µL da solução teste aos poços da primeira coluna e, então, realizado uma diluição seriada até a nona coluna, resultando nas seguintes concentrações: 4000, 2000, 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,63 µg/ml. Em seguida foram adicionados 5 µl da suspensão padronizada de microrganismos em todos os poços e incubadas a 37 ± 2 °C durante 48 h. Para as leveduras foi utilizado

o meio RPMI-1640 com 0,05% de vermelho de fenol suplementado com 10% glicose e a diluição do OE foi a mesma utilizada para as bactérias. Em todos os ensaios foram realizados os controles do meio de cultura, do inóculo, do OE e seus complexos.

-Concentração bactericida (CBM)/ fungicida mínima (CFM)

Para que fosse determinados CBM e CFM foi retirado 10 µL do meio de cultura dos poços nos quais a concentração mínima inibitória (MIC) foi positiva, e essa quantidade foi plaqueada em Ágar Müller-Hinton, incubadas a 37 ± 2 °C por 24 h para as bactérias, e ágar Sabouraud dextrose 37 ± 2 °C por 48 h para as leveduras.

Resultados e Discussão

Concentração inibitória mínima (CIM)

Na tabela 1, os resultados do CIM indicaram a menor concentração possível da droga capaz de inibir o crescimento microbiano *in vitro*. Isso foi evidenciado pela ausência de turvação no meio de cultura nas diluições demonstradas na tabela para cada microrganismo, o que indicou a eficácia da inibição do óleo.

Tabela 1- Resultados da concentração inibitória mínima dos microrganismos (µg/ml)

Microrganismo	CIM (µg/mL)
<i>Bacillus subtilis</i>	500
<i>Candida albicans</i>	500
<i>Candida parapsilosis</i>	250
<i>Candida tropicalis</i>	500
<i>Escherichia coli</i>	250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	500
<i>Samonella enteritidis</i>	250
<i>Staphylococcus aureus</i>	500

Concentração bactericida (CBM)/ fungicida mínima (CFM)

Os dados abaixo são os resultados das concentrações bactericidas e fungicidas mínimas feitas com o óleo livre, amassamento, co-precipitação e mistura física (Tabela 2).

Tabela 2- Resultado da concentração bactericida e fungicida mínima dos microrganismos com a utilização dos óleos e seus complexos (µg/ml)

Microrganismo	CBM/CFM (µg/mL)			
	Óleo livre	Amassamento	Co-precipitação	Mistura física
<i>Bacillus subtilis</i>	500	>4000	>4000	>4000
<i>Candida albicans</i>	500	1000	1000	1000
<i>Candida parapsilosis</i>	500	1000	1000	1000
<i>Candida tropicalis</i>	500	1000	1000	1000
<i>Escherichia coli</i>	250	2000	2000	2000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	500	2000	2000	2000
<i>Samonella enteritidis</i>	250	2000	2000	4000
<i>Staphylococcus aureus</i>	1000	2000	2000	>4000

Nota-se que o melhor desempenho foi o com óleo livre, visto que apresentou uma menor concentração mínima entre 250 e 1000 µg/ml. Também é possível observar que os complexos de inclusão reduziram a atividade antimicrobiana do OE. É possível sugerir que isso possa ter ocorrido devido à forte ligação com a beta-CD e a dificuldade na liberação do OE para exercer sua função antimicrobiana e fungicida.

Conclusões

Com essa pesquisa foi possível confirmar que o OE de orégano, dentre as diversas propriedades químicas e biológicas que apresenta, destaca-se pela atividade antimicrobiana, que tem grande interesse para a culinária e para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos. Contudo, os complexos de inclusão se mostraram menos ativos, o que pode ser devido à forte ligação com a beta-CD e a dificuldade na liberação do OE para exercer sua função antimicrobiana. Novos estudos são sugeridos para verificar a razão da perda de atividade, e a possibilidade da complexação para proteção da oxidação do OE. Portanto, os resultados deste trabalho mostraram-se promissores, visto que o OE de orégano apresentou uma capacidade antimicrobiana bastante interessante, podendo ser superior a outros OE, com uma quantidade menor e com um preço mais acessível, fomentando sua utilização nos diversos setores industriais, como indústria farmacêutica e alimentícia.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq, orientadora, co-orientadora, integrantes do Laboratório de Biotecnologia Enzimática e a UEM pela oportunidade e concessão de bolsa.

Referências

CARVALHO, J. A. M. et al. Composição Química e Avaliação da Atividade Antimicrobiana do Óleo de Pimenta Rosa (*Schinus terebinthifolius*). **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 4, n. 1, p. 59-63, 2017.

DELAQUIS, P. J. et al. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 101-109, 2002.

GALVÃO, J. G. et al. β -cyclodextrin inclusion complexes containing *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oil: An alternative to control *Aedes aegypti* larvae. **Thermochimica Acta**, v. 608, p. 14–19, 2015.

PINTO, L. M. A. et al. Physico-chemical characterization of benzocaine- β -cyclodextrin inclusion complexes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, n. 5, p. 956–963, 2005.

31º Encontro Anual de Iniciação Científica
11º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



10 e 11 de novembro de
2022

SAGIRI, S. S.; ANIS, A.; PAL, K. Review on Encapsulation of Vegetable Oils: Strategies, Preparation Methods, and Applications. **Polymer - Plastics Technology and Engineering**, v. 55, n. 3, p. 291–311, 2016.