

Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e extratos da *Curcuma longa*

Paola Passolongo Paludo, Renata Nátali Schimiloski, Beatriz Lemes Almeida, Felipe Augusto Chimenez Pinto, Conceição de Fátima Alves Olguin, Cleide Viviane Buzanello Martins

Universidade Estadual do Oeste do Paraná, CECE, Rua da Faculdade, 645, 85903-000, Toledo, PR.

E-mail autor correspondente: paludo.paola21@gmail.com

Artigo enviado em 16/11/2019, aceito em 12/12/2019.

Resumo: O aumento do uso de fármacos propiciou um elevado número de resíduos jogados em vias hídricas; uma possibilidade de diminuir esses danos ambientais é o uso de fitofármacos. Assim, este estudo teve como objetivo testar *in vitro* pelo método de difusão em disco de papel a susceptibilidade de *Candida albicans* (CAN14), *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans* aos extratos aquoso, etanólico bem como o óleo essencial da *Curcuma longa* conhecida por açafrão da terra. Verificou-se que óleo essencial apresentou resultado positivo para a maioria dos fungos, exceto *C. glabrata*. O extrato etanólico foi o mais eficiente a *C. tropicalis*. Vale destacar que todos os extratos foram mais eficientes frente a *C. tropicalis* e *C. krusei* quando comparados com o controle positivo cetoconazol.

Palavras-chave: Curcuma, extrato etanólico, antimicrobiana.

Evaluation of antimicrobial activity of essential oil and extracts of *Curcuma longa*.

Abstract: The increase in the use of drugs resulted in a high number of residues thrown in water pathways. A possibility of reducing such environmental damage is the use of phytodrugs containing compounds with active principles similar to those of drugs. Thus, the objective of this study had as objective to test the susceptibility *in vitro* of *Candida albicans* (CAN14), *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans* against essential oil, ethanol aqueous extracts of *Curcuma longa* known as saffron of the earth. The method used was paper disc diffusion method. It was found that essential oil showed positive results to the most of the yeast, except *C. glabrata*. The ethanolic extract was the most efficient for all the microorganisms tested. The aqueous extract inhibited more efficiently *C. tropicalis*. It is worth mentioning that all extracts were more efficient against *C. tropicalis* and *C. krusei* in comparison with the positive control ketoconazole.

Keywords: Curcuma, ethanol extract, antimicrobial.

Introdução

A indústria farmacêutica é responsável por sintetizar substâncias químicas farmacologicamente ativas, tendo como objetivo sua utilização como medicamento para fins profiláticos, ou curativos de algum diagnóstico. Com o amplo crescimento da tecnologia, a produção de fármacos é cada vez mais solicitada, uma vez que o maior desafio do homem é aumentar sua expectativa de vida e conseqüentemente sua saúde (AKKARI et al., 2016).

O crescente aumento do uso de fármacos pelo homem gera outra preocupação que é referente ao seu descarte. Muitos desses fármacos são descartados de forma inadequada, seja diretamente ou até indiretamente, tanto pelas indústrias, como também por fontes veterinárias ou humanas. Uma vez no meio ambiente, o mesmo se comporta como contaminante e acaba sendo prejudicial ao ser humano, e aos animais aquáticos.

Tanto na medicina veterinária quanto na humana, após a sua utilização, o medicamento é excretado e transportado por vias hídricas ao ambiente e, uma vez não tratado de forma correta, o mesmo é transferido para águas superficiais, podendo ser encontrado até em água potável (HEBERER, 2002).

Devido à ação biológica dos fármacos mesmo em baixas concentrações, em grande quantidade, pode se tornar um risco tóxico alterando o sistema endócrino dos seres vivos; um exemplo é a grande quantidade de estrogênio que são descartados nos efluentes, estes podem afetar o sistema reprodutivo dos peixes (TERNES et al., 1999). Outro exemplo, é a quantidade excessiva de antibióticos descartados,

propiciando assim, a criação de microrganismos mais resistentes a antibióticos (HIRSCH et al., 1999). Já em seres humanos, há alterações no sistema endócrino, causando distúrbios, onde, dependendo da concentração do fármaco em que foi exposto, há a possibilidade de estarem relacionados com doença como câncer de mama, de próstata e testicular (HARRISON, 1997).

Um grupo de fármacos que chama a atenção, são os antimicóticos, ou antifúngicos, que são medicamentos que agem inibindo a proliferação de fungos e bactérias numa região específica do corpo, conhecida por gerar problemas como micoses, dermatofitoses e até candidíase. Os antifúngicos ao serem descartados, seja via medicinal ou agrária, provoca contaminação no solo podendo acarretar diversos problemas, como a geração de fungos mais resistentes, e conseqüentemente a necessidade de medicamentos mais poderosos, vale destacar que este é um dos grandes desafios da medicina (VALLABHANENI et al., 2015). Outro grande problema, são os fungicidas, utilizados na agricultura como pesticidas com o objetivo de proteger as plantas, entretanto, muitos desses produtos são tóxicos, podendo contaminar o solo e a água (VIANA et al., 2009).

Dito isto, uma possível alternativa para combater o uso exagerado de fármacos sintéticos, é a utilização de produtos naturais como fitoterápicos, uma vez que o mesmo é retirado de uma fonte natural e não contém uma substância isolada. Um fitoterápico é um extrato vegetal, na qual contém substâncias químicas e farmacológicas totalmente quantificadas e aprovadas por um sistema rigoroso de controle de qualidade, sendo

considerado um produto seguro, barato e eficaz (WORLD HEALTH ORGANIZATION et al., 1998). Algumas das vantagens dos fitoterápicos estão no efeito sinérgico entre si, onde substâncias unidas do próprio extrato podem ter um efeito mais satisfatório do que somente um atuando. Existe menos risco utilizando os fitoterápicos, pois as substâncias são encontradas em concentrações muito baixas em seus extratos; além de que o custo da sua produção e desenvolvimento é bem inferior ao de um novo fármaco produzido, que pode chegar a custar milhões de reais (KAUFMAN et al., 1998).

As plantas medicinais possuem diversas substâncias ativas, nas quais podem ser utilizadas para problemas variados, tanto como estresse e ansiedade, até como atividade antiviral e anti-inflamatória. A *Curcuma longa*, popularmente conhecida como açafrão-da-terra, é uma planta originária do sudeste asiático, da família Zingiberaceae, sendo muito encontrada nos morros de florestas tropicais da Índia e utilizada na medicina tradicional oriental desde a Antiguidade. A parte que há mais utilização, é seu rizoma, no qual, ao ser moído, apresenta-se em forma de pó, de coloração dourada denominada como turmerico, amplamente utilizada como corantes devido a sua cor intensa, como também na gastronomia como condimento (MATOS, 2000).

Em relação à suas propriedades farmacológicas, há estudos que indicam que os seus extratos e óleos essenciais, extraídos principalmente de seu rizoma, contém propriedades antioxidantes, anti-inflamatória e antimicrobiana. O óleo essencial é rico em sesquiterpenos oxigenados, o que dá a ele características aromáticas, como o α -turmerone e β -turmerone, enquanto em relação a coloração de seu rizoma, os

curcuminóides são os responsáveis, compostos como a curcumina, a desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina dão a ele pigmentos fenólicos amarelados utilizados como corantes nas indústrias têxtil. Estudos *in vitro* mostraram atividade antibacteriana do óleo essencial, inibindo o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus typhosus*, além disso, estudos de atividade antioxidante, mostraram que seus curcuminóides, principalmente a curcumina, atua reduzindo a peroxidação lipídica, aumentando a atividade de enzimas antioxidantes e neutralizando os radicais livres (ARAUJO, 2001).

Embora existam diversos estudos sobre a *Curcuma longa*, é necessário que se desenvolva pesquisas sobre a mesma, pois em um estudo realizado na China, onde uma planta coletada em 20 locais diferentes apresentou resultados diferentes nos testes biológicos realizados (ZHANG et al., 2017).

Este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial e extratos do açafrão-da-terra.

Material e Métodos

Coleta e processo de sanitização do açafrão-da-terra

Para a realização dos testes, coletaram-se aproximadamente, 2 kg dos rizomas da *Curcuma longa* (Zingiberaceae), conhecida popularmente como açafrão-da-terra em Francisco Beltrão/Paraná, situada a 26°04'20"S e 53°03'20"W. Fez-se uma lavagem manual com água corrente, e imergiu-se em solução de água clorada 100 mg/L e deixou-se por 10 minutos. Em seguida, enxaguou-se com água destilada e secou-se com papel. Os rizomas foram mantidos sob refrigeração, na ausência de luz.

Preparação dos extratos

Para a extração do óleo essencial foi utilizado o aparelho Clevenger. Foram utilizados 200 g do rizoma picados em cubos pequenos e 1000 mL de água destilada. O sistema foi mantido sob aquecimento a 100 °C durante 4 horas. Coletou-se o óleo essencial (EO) que foi armazenado em recipiente de vidro âmbar e mantido sob refrigeração a uma temperatura de 8 °C. A solução aquosa contendo os rizomas foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo. O resíduo foi denominado de extrato aquoso (EA). O rizoma, após a extração do óleo, foi colocado para secar em estufa a 45 °C por 24 horas. Após a secagem, o açafrão desodorizado, foi submetido a uma extração com etanol em aparelho Soxhlet. Após 5 horas de extração a uma temperatura de 75 °C, o etanol foi concentrado fornecendo o extrato etanólico (EE) (SANTOS et al., 2004).

Atividade antimicrobiana

Foram utilizadas as cepas: *Candida albicans* (CAN14), *Candida parapsilosis* (CP), *Candida tropicalis* (CT), *Candida glabrata* (CG), *Candida krusei* (CK) e *Cryptococcus neoformans* (CN). Todas as cepas foram isolados clínicos. Para a preparação de amostras, pesou-se 10 mg de cada amostra e diluiu-se em 20 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) 980 µL de metanol (MeOH). Também foi utilizado, açafrão em pó comercial como amostra (EC). A metodologia empregada foi à técnica difusão em discos de papel utilizando-se como antifúngico padrão: cetoconazol

(solução estoque 1 mg/mL) e como meio ágar Mueller Hinton modificado (azul de metileno e 2% de glicose). As suspensões foram feitas em solução salina em concentração entre $1,0 \times 10^6$ e $5,0 \times 10^6$ células/mL, com turbidez 0,5 da escala nefelométrica de McFarland ou no espectrofotômetro a 530 nm (75-77% T) dos microrganismos teste; os mesmos foram semeados na superfície do meio, em placas de Petri, com auxílio do Drigalsky. As placas com os discos aplicados foram incubadas a 35°C durante 24h. Os testes foram realizados em duplicata e os resultados expressos em mm pela média aritmética do diâmetro dos halos de inibição formado ao redor dos discos nas 2 repetições. O teste controle (Cn) foi realizado com discos embebidos em uma solução de DMSO e MeOH. Para o fungo *C. neoformans* fez-se outra leitura após 48h (TEVONER et al., 1999; FERRARO, 2000). Foi determinado o semi-MIC (Concentração Inibitória Mínima), onde as amostras testadas foram diluídas em caldo Mueller Hinton modificado até a concentração de 256 e 128 ppm. Como controle positivo foi utilizado fluconazol e cetoconazol nas concentrações de 64, 32, 16, 8 e 4µg/mL. Também foram testados os fungos *Candida albicans* (CCCD-CD001) e *Candida albicans* (ATCC-UFGM)18804.

Resultados e discussão

A partir de 1863,2 g do rizoma foram obtidos 4,1 g do óleo essencial (0,2%), 10,9 g do extrato aquoso (11,1%) e 122,3 g de extrato etanólico (30,9%).

Os halos de inibição (em mm) observados no teste em disco de papel estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Halos de inibição (mm) observados no teste de difusão em disco de papel.

Amostras	CAN14	C.G	C.P	C.T	C.K	C.N
EO	12,0	0	10,5	13,0	12,5	11,5
EE	14,0	10,5	10,5	12,5	12,0	10,5
EA	10,5	0	10,5	13,5	11,5	4,0
EC	12,0	10,5	10,5	13,5	9,0	10,5
Cetoconazol	30,0	11,5	22,5	12	4,5	21,5
Cn	10,0	0	0	0	4,0	9,0

CAN14 – *Candida albicans*; C.G – *Candida glabrata*; C.P – *Candida parapsilosis*; C.T – *Candida tropicalis*; C.K – *Candida krusei*; C.N – *Cryptococcus neoformans*; EO – Óleo essencial; EE – Extrato etanólico; EA – Extrato aquoso; EC – Açafrão em pó comercial; Cn – Controle negativo.

Pode ser observado que o óleo essencial (EO) apresentou resultado positivo para a maioria dos fungos, exceto *C. glabrata*. O extrato etanólico (EE) foi o mais eficiente para todos os microrganismos testados, sendo inclusive mais efetivo que a cúrcuma comercial (EC). O extrato aquoso inibiu

com mais eficiência a *C. tropicalis*. Vale destacar que todos os extratos foram mais eficientes frente a *C. tropicalis* e *C. krusei* quando comparados com o controle positivo cetoconazol. A Figura 1 mostra os halos de inibição para *C. tropicalis* e *C. krusei*.

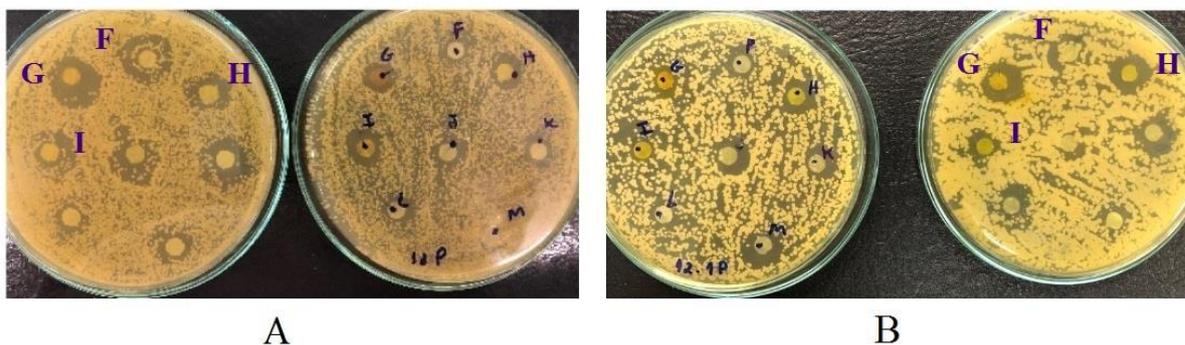


Figura 1. Halos de inibição para *Candida tropicalis* (A) e *Candida krusei* (B) frente ao óleo essencial (F), ao extrato etanólico (G), ao extrato aquoso (H) e o açafrão em pó comercial (I).

Alguns estudos na literatura demonstraram atividade antimicrobiana do açafrão, como o trabalho de Niamsa et al. (2009), que verificaram atividade do extrato aquoso da *Curcuma longa*, frente a *S. epidermis*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *E. coli*. Ungphaiboon et al. (2005) observaram que o extrato metanólico da *C. longa* apresentou atividade antimicrobiana contra *B. subtilis* e *S. aureus*.

No teste do semi-MIC pode-se observar na Tabela 2 que os extratos

(EE e EA) nas duas concentrações testadas não inibiram os fungos *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida albicans* (CCCD-CC001). O extrato etanólico (EE) e a curcumina comercial (EC) inibiram a *C. albicans* (ATCC 18804) e *C. albicans* (CAN14) nas duas concentrações. Todos os extratos inibiram o *C. neoformans* mesmo na menor concentração 128 ppm e somente o óleo essencial inibiu a *C. krusei*.

Tabela 2. Resultados da semi concentração inibitória mínima.

Amostras	[]*	Microrganismos							
		CA**	C.14	C.G	C.K	C.P	C.T	CA***	C.N
EO	128				+				+
	256				+				+
EE	128	+	+						+
	256	+	+						+
EA	128								+
	256						+		+
EC	128	+	+						
	256	+	+						+

* Concentração ppm; CA** ATCC 18804; CA*** CCCD-CD001; + Inibiu; CAN14 – *Candida albicans*; C.G – *Candida glabrata*; C.P – *Candida parapsilosis*; C.T – *Candida tropicalis*; C.K – *Candida krusei*; C.N – *Cryptococcus neoformans*; EO – Óleo essencial; EE – Extrato etanólico; EA – Extrato aquoso; EC – Açafração em pó comercial.

Diversos estudos encontrados na literatura, indicaram que o óleo essencial do açafração é um agente antimicrobiano, pois possuem substâncias bioativas como os fenóis, terpenos, aldeídos e cetonas. (BRAGA et al., 2003; MATA et al., 2004). Conforme Negiet al. (1999) e Lee et al. (2003) o percentual do sesquiterpeno ar-turmerona presente no óleo tem potencial efeito antifúngico. Outros estudos demonstraram que os compostos ar-turmerona e curlona presentes no óleo essencial foram ativos frente à *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger* (SINGH et al., 2011). No trabalho de Singh et al. (2002), o óleo essencial na concentração de 1000 ppm causou uma completa inibição micelar contra *Fusarium moniliforme* e *Colletotricum falcatum*. Já David (2013) obteve resultados positivos frente a cepas de *Candida spp* para o extrato hexânico de *Curcuma longa* nas concentrações de 62 e 184 µg mL⁻¹.

Embora neste trabalho o óleo essencial (OE) tenha sido eficiente somente para *C. krusei*, os resultados observados na literatura corroboram para o fato de que o clima, solo e época de colheita podem influenciar a composição química de uma planta, uma vez que estes trabalhos foram realizados em distintos lugares do mundo.

Conclusões

Neste trabalho observou-se que o óleo essencial apresentou resultado positivo para a maioria dos fungos, exceto *C. glabrata*. O extrato etanólico foi o mais eficiente frente aos microrganismos testados na concentração de 128 ppm. Posteriormente, será necessário investigar os principais compostos presentes neste extrato que são responsáveis por essa atividade.

Referências

AKKARI, A.C.S. et al. Inovação tecnológica na indústria farmacêutica: diferenças entre a Europa, os EUA e os países farmaemergentes. **Gestão & Produção**, v. 23, n. 2, p. 365-380, 2016.

- ARAUJO, C.A.C.; LEON, L.L. Biological activities of *Curcuma longa* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 723-728, 2001.
- BRAGA, M.E.M. et al. Comparison of yield, composition, and antioxidant activity of turmeric (*Curcuma longa* L.) extracts obtained using various techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 22, p. 6604-6611, 2003.
- DAVID, L.E. Avaliação das Atividades Citotóxica, Antifúngica e do Potencial de Segurança in vivo de ar-turmerona (*Curcuma longa* L.). **Guarapuava [Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas-Unicentro]**, 2013.
- FERRARO, M.J. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. NCCLS, 2000.
- HARRISON, P.T.C.; HOLMES, P.; HUMFREY, C.D.N. Reproductive health in humans and wildlife: are adverse trends associated with environmental chemical exposure?. **Science of the Total Environment**, v. 205, n. 2-3, p. 97-106, 1997.
- HEBERER, T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. **Toxicology letters**, v. 131, n. 1-2, p. 5-17, 2002.
- HIRSCH, R. et al. Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 815, n. 2, p. 213-223, 1998.
- KAUFMAN, P.B. et al. **Natural products from plants**. CRC Press Inc., 1998.
- LEE, H.S. et al. Fungicidal activity of ar-turmerone identified in *Curcuma longa* rhizome against six phytopathogenic fungi. **Journal of Applied Biological Chemistry**, v. 46, n. 1, p. 25-28, 2003.
- MATA, A.R. et al. Identificação de compostos voláteis da cúrcuma empregando microextração por fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. 2004.
- MATOS, F.J.A. Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. **Fortaleza: UFC**, 2000.
- NEGI, P.S. et al. Antibacterial activity of turmeric oil: a byproduct from curcumin manufacture. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 47, n. 10, p. 4297-4300, 1999.
- NIAMSA, N. et al. Antimicrobial activity of *Curcuma longa* aqueous extract. **Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 4, n. 4, p. 173-177, 2009.
- SANTOS, A.S. et al. Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. **Embrapa Amazônia Oriental- Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2004.
- SINGH, G.; SINGH, O.P.; MAURYA, S. Chemical and biocidal investigations on essential oils of some Indian *Curcuma* species. **Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials**, v. 45, n. 1-2, p. 75-81, 2002.
- SINGH, S. et al. Chemical composition of turmeric oil (*Curcuma longa* L. cv. Roma) and its antimicrobial activity against eye infecting pathogens. **Journal of Essential Oil Research**, v. 23, n. 6, p. 11-18, 2011.
- TENOVER, F.C. et al. Methods for improved detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci: results of a multicenter study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 12, p. 4051-4058, 1999.
- TERNES, T.A. et al. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants—I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 225, n. 1-2, p. 81-90, 1999.
- UNGPHAIBOON, S. et al. Study on antioxidant and antimicrobial activities of

turmeric clear liquid soap for wound treatment of HIV patients. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 27, n. 2, p. 269-578, 2005.

VALLABHANENI, S. et al. Epidemiology and risk factors for echinocandinnonsusceptible *Candida glabrata* bloodstream infections: data from a large multisite population-based candidemia surveillance program, 2008–2014. In: **Open forum infectious diseases**. Oxford University Press, 2015.

VIANA, J.H.M. et al. Avaliação da variabilidade espacial do solo em experimentos de eficiência nutricional em milho, conduzidos em área com baixos

teores de nutrientes: um estudo de caso. **Embrapa Milho e Sorgo-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review**. Geneva: World Health Organization, 1998.

ZHANG, L. et al. Composition and bioactivity assessment of essential oils of *Curcuma longa* L. collected in China. **Industrial crops and products**, v. 109, p. 60-73, 2017.