

## EFEITO ANTIFÚNGICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *RHAPHIODON ECHINUS* CONTRA A CEPA *CANDIDA TROPICALIS*

Maria Aparecida Vieira Lopes<sup>1</sup>; Emanuelle Alves Ferreira<sup>1</sup>; José Lucas Soares Ferreira<sup>1</sup>; Gabriela Lemos de Azevedo Maia<sup>3</sup>; Abrahão Alves de Oliveira Filho<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Acadêmicos do curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

E-mail: [m.aparecidavieiralopes@gmail.com](mailto:m.aparecidavieiralopes@gmail.com)

E-mail: [Emanuelle-alves2013@hotmail.com](mailto:Emanuelle-alves2013@hotmail.com)

E-mail: [jlucas\\_sf@hotmail.com](mailto:jlucas_sf@hotmail.com)

<sup>2</sup> Professor Adjunto do curso de odontologia da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)- Campus Patos-PB.

E-mail: [abrah](mailto:abrah)

<sup>3</sup> Professor Adjunto do curso de farmacologia da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF)- Campus Petrolina-PE

**Resumo:** Cerca de 25 a 75% de indivíduos saudáveis podem apresentar alguns gêneros da *Candida* na mucosa bucal, porém cerca de oito espécies podem desencadear a doença candidíase oral e uma delas é a *Candida tropicalis*, a infecção por esse agente ocorre em todas as idades, mas acomete adultos e idosos com maior frequência. Ela se mostrou muito resistente aos antifúngicos farmacológicos, devido o seu uso indiscriminado. Com isso surgiu à necessidade de buscar novos métodos de tratamento através de plantas naturais. Em muitos órgãos vegetais são encontrados óleos essenciais, cientificamente comprovados que cerca de 60% desses óleos tem capacidade antifúngica e 35% antibacterianas. Esse trabalho vem com intuito de avaliar o poder antifúngico do óleo essencial extraído da *Rhaphiodos echinus*. Para a determinação da CIM (Concentração inibitória mínima) das substâncias, foi realizada utilizando a técnica da microdiluição em caldo. Utilizou-se as cepas da *Candida tropicalis* (ATCC 13803, LM 14, LM 31, LM 36). gentilmente cedidas pelo Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba. Obteve-se o controle de viabilidade das cepas ensaiadas, e também controle de sensibilidade destas cepas ao antimicrobiano Nistatina 100 UI/mL. Pode-se observar que todos os compostos avaliados apresentaram uma CIM 50 (Concentração Inibitória Mínima para 50 % das cepas testadas) de 512 µg/mL para as cepas fúngicas testadas. Conclusão: conclui-se que o óleo essencial extraído da *Rhaphiodos echinus* teve um poder antifúngico moderado e pode ser uma alternativa para o tratamento de infecções fúngicas causadas por cepas de *Candida tropicalis*.

**Palavras-chave:** antifúngicos, óleo essencial, *Candida tropicalis*, *Rhaphiodos echinus*, *Lamiaceae*.

**Abstract:** Approximately 25 to 75% of healthy individuals may show some genera *Candida* buccal mucosa, but about eight species can trigger oral candidiasis disease and one of them is *Candida tropicalis* infection by this pathogen occurs at all ages, but affects adults and elderly more often. She proved to be very resistant to antifungal drug, because its indiscriminate use. Thus arose the need to seek new methods of treatment using natural plants. In many plant organs are found essential oils scientifically proven that about 60% of these oils have antifungal antibacterial ability and 35%. This work is designed to evaluate the antifungal power of the essential oil extracted from *Rhaphiodos echinus*. For the determination of MIC (minimum inhibitory concentration) of the

(83) 3322.3222

[contato@conidis.com.br](mailto:contato@conidis.com.br)

[www.conidis.com.br](http://www.conidis.com.br)

substance was performed using the broth microdilution technique. We used the strains of *Candida tropicalis* (ATCC 13803, LM 14, the LM 31, the LM 36). courtesy of the Mycology Laboratory of the Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba. Was obtained control of viability of the tested strains, and also control sensitivity of these strains to antimicrobial Nystatin 100 IU / mL. It can be seen that all the compounds evaluated had an MIC 50 (minimum inhibitory concentration for 50% of tested strains) to 512 / mL for the tested fungal strains. Conclusion: it is concluded that the essential oil extracted from *Rhaphiodos echinus* had a moderate antifungal power and can be an alternative for the treatment of fungal infections caused by strains of *Candida tropicalis*.

**Keywords:** Antifungal essential oil, *Candida tropicalis*, *Rhaphiodos echinus*, *Lamiaceae*.

## 1. INTRODUÇÃO

Varias espécies de microrganismos podem habitar na mucosa oral, sem desencadear algum processo infeccioso. De 25 a 75% de indivíduos saudáveis podem apresentar alguns gêneros da *Candida* na mucosa bucal. Porém cerca de oito espécies da *Candida* podem desencadear a doença candidíase oral, que são elas: *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida viswanathii* e *Candida glabrata* (JORGE et al.,2008)

Para o tratamento da candidíase é utilizado drogas azólicas. Que são quimioterápicos antifúngicos e compreende as drogas de uso sistêmico, o miconazol, o cetoconazol, o fluconazol e o itraconazol. (TAVARES, 2001). O uso indiscriminado de medicamentos antifúngicos, pela falta de informações sobre o fenótipo, moléculas e sensibilidade das cepas. (CLEFF, 2008). Favorece ao surgimento de cepas resistentes, devido à capacidade de mutações próprias dos fungos. (HAMDAN E HAHN, 2006).

A *Candida tropicalis* que é um gênero da cândida, é um agente frequente em hospitais brasileiros, a infecção por esse agente ocorre em todas as idades, mas acomete adultos e idosos com maior frequência. Ela é bastante resistente aos azólicos, devido à expressão do gene ERG11, associada a uma mutação missense nesse gene. Algumas cepas da *Candida tropicalis* são resistentes ao fluconazol, itraconazol e a outros antifúngicos. (BOUCHARA et al., 2005) (DASSANAYAKE et al., 2006) (CUNHA et al., 2009).

Essa situação alerta os pesquisadores sobre a necessidade de encontrar um novo meio de combate, um ponto de partida é investigar plantas medicinais e encontrar alguma substância antimicrobiana. (Abílio et al.,2014). Em muitos órgãos vegetais são encontrados óleos essenciais, que são responsáveis por funções necessárias à sobrevivência do vegetal e na defesa contra microrganismos. (Siqui et al., 2000). São líquidos extraídos de materiais vegetais como flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas de madeira, frutos e raízes. (guenther, 1948). Cientificamente foi comprovado que cerca de 60% desses óleos tem capacidade antifúngica e 35% antibacterianas. Além de ter ação, antivirais, antioxidantes e inseticidas (Bhavanani;Ballow, 1992) (BRAAK; LEIJTEN, 1994).

A espécie *Rhaphiodon Echinus* faz parte da família *Lamiaceae* e é encontrada em vasta disponibilidade na região Nordeste no Brasil, chamada popularmente de Betônica, é utilizada pela

população no tratamento de tosse, a partir do extrato aquoso obtido da planta. Esse extrato apresentou ação anti-inflamatória e analgésica. (Menezes et al., 1998). No entanto, nenhum estudo de atividade antifúngica foi realizado com o óleo essencial extraído das folhas de *Raphiodon echinus*

Tomando as informações citadas acima como base, diante dos altos índices negativos de resistência da candidíase a antifúngicos, há uma grande necessidade de encontrar novos métodos de tratamento antifúngicos, como por exemplo o tratamento fitoterápico com óleos essenciais, como os extraídos da *Rhaphiodon Echinus*.

Neste contexto, este estudo objetiva analisar o potencial antifúngico do óleo essencial extraído da planta *Rhaphiodon Echinus*, sobre a cepa *Candida tropicalis* por meio de testes *in vitro*.

## 2. METODOLOGIA E VIABILIDADE

### 2.1 Ensaios *in vitro*

#### 2.1.1 Substância-teste

Nos ensaios se utilizou o óleo essencial extraído das folhas de *Raphiodon echinus*, que foi cedido pela equipe da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gabriela Lemos de Azevedo Maia, da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF).

O óleo foi conservado em um frasco de vidro âmbar e mantido sob refrigeração. As emulsões do óleo essencial nas diferentes concentrações foram preparadas no momento de execução dos ensaios. Em um tubo de ensaio esterilizado, foi adicionado 60.000 µg do óleo essencial, 0,15 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), 0,06 mL de Tween 80 (INLAB/Indústria Brasileira) e quantidade suficiente para 3 mL de água destilada estéril. A mistura foi agitada por 5 minutos em aparelho Vortex (Fanem), obtendo uma emulsão com concentração de 20.000 µg/mL do óleo essencial, 5% de DMSO e 2% de Tween 80. Através de diluições em água destilada ou no próprio meio de cultura foram obtidas as concentrações desejadas do óleo essencial.

#### 2.1.2 Espécies Fúngicas

Foram utilizadas quatro cepas de *Candida tropicalis* (ATCC 13803, LM 14, LM 31, LM 36) previamente isoladas, identificadas e gentilmente cedidas pelo Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, sob a direção da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Edeltrudes de Oliveira Lima.

Todas as cepas foram mantidas em ágar Sabouraud dextrose (ASD) a uma temperatura de 4°C, sendo utilizados para os ensaios repiques de 24 horas em ASD incubados a 35 °C. No estudo da atividade antimicrobiana se utilizou um inóculo fúngico de aproximadamente 1 - 5 x 10<sup>6</sup> UFC/mL padronizado de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK, GREGER, 2000).

#### 2.1.3 Meios de cultura

Utilizou se os meios ágar Sabouraud dextrose - ASD (Difco Lab., USA) para manutenção dos micro-organismos; e caldo Sabouraud dextrose - CSD (Difco Lab., USA) para os ensaios *in vitro*; preparados conforme as instruções do fabricante.

#### 2.1.4 Fármaco antifúngico

Foi utilizado como antifúngico padrão (controle positivo), a nistatina em pó (Pharma Nostra, Rio de Janeiro). As soluções foram preparadas no momento de execução dos testes, para alcance das concentrações desejadas.

### 2.1.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração inibitória mínima do óleo essencial de *Raphiodon echinus* foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK, GREGER, 2000). Foram utilizadas placas de 96 orifícios estéreis e com tampa. Em cada orifício da placa, foi adicionado 100 µL do meio líquido caldo Sabouraud dextrose duplamente concentrado. Em seguida, 100 µL da emulsão do óleo essencial na concentração inicial de 2048 µg/mL (também duplamente concentrado), foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada em razão de dois, obteve-se as concentrações de 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 e 4 µg/mL, de modo que na primeira linha da placa encontravam-se a maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim, foi adicionado 10 µL do inóculo de aproximadamente  $1-5 \times 10^6$  UFC/mL das espécies fúngicas nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica, especificamente.

Paralelamente, realizou-se o mesmo ensaio com o antifúngico nistatina nas concentrações de 1024 µg/mL a 4 µg/mL. Um controle de micro-organismo foi realizado e colocou nas cavidades 100 µL do mesmo CSD duplamente concentrado, 100 µL de água destilada estéril e 10 µL do inóculo de cada espécie. Para verificar a ausência de interferência nos resultados pelos solventes foi utilizado na preparação da emulsão, no caso o DMSO (dimetilsulfóxido) e o Tween 80, foi feito um controle no qual colocou-se nas cavidades 100 µL do caldo duplamente concentrado, 50 µL de DMSO (5%), 50 µL de Tween 80 (2%) e 10µL da suspensão fúngica. Um controle de esterilidade do meio também foi realizado, onde foi colocado 200 µL do CSD em um orifício sem a suspensão dos fungos.

As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a 35°C por 24 - 48 hs e se realizou a leitura. A CIM para o óleo essencial e antifúngico foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico verificado nos orifícios quando comparado com o crescimento controle. Os experimentos foram realizados em duplicata.

## 3. RESULTADO E DISCUSSÃO

Após a realização dos protocolos acima, os testes *in vitro* mostraram uma atividade antifúngica positiva em algumas concentrações do óleo essencial extraído da planta *Rhaphiodon Echinus* sobre a cepa *Candida tropicalis*, o que se observa na tabela abaixo.

**Tabela 1.** Atividade antifúngica do óleo essencial de *Rhaphiodon echinus* (OERE).

Espécie fúngica Substância	<i>Candida Tropicalis</i> ATCC 13803	<i>Candida Tropicalis</i> LM 14	<i>Candida Tropicalis</i> LM 31	<i>Candida Tropicalis</i> LM 36
OERE (1024 µg/ml)	-	-	-	-
OERE (512 µg/ml)	-	-	-	+
OERE (256 µg/ml)	+	+	+	+
OERE (128 µg/ml)	+	+	+	+

Controle negativo	-	-	-	-
Controle positivo	+	+	+	+

(-) inibição da cepa (+) crescimento da cepa.

Diante do observado na tabela, verificou-se que a concentração igual e maior que 512 µg/ml da substância apresentou uma inibição do crescimento da cepa ATCC 13803 assim como as cepas LM 14 e LM 31, o que significa que o óleo essencial da planta *Rhaphiodon Echinus* nessas concentrações podem inibir o crescimento dessas cepas da *Candida tropicalis*. Mas a cepa LM 36 apresentou certa resistência na concentração 512 µg/ml, porém em uma concentração de 1024 µg/mL da substância se obteve um resultado inibitório no crescimento da cepa. Segundo Sartoratto et al (2004), os valores entre 50-500 µg/ml tem uma forte atividade, 600-1500 µg/ml tem uma moderada atividade e os valores acima de 1500 µg/ml tem uma fraca atividade. Seguindo esse conceito o poder inibitório do crescimento do óleo essencial da *Rhaphiodon echinus* é considerado moderado, sobre a *Candida tropicalis*.

Outros estudos também revelaram o poder inibitório antifúngico dos óleos essenciais. Segundo Lima et al. (2006), que analisou óleos essenciais de seis espécies vegetais regionais, de reconhecidas propriedades, para a atividade antifúngica em laboratório. Dentre as quais pertencem à família das laminaceas a *Peumus boldus Benth* e *Rosmarinus officinalis* que possuem atividade antifúngica comprovada em testes. Na qual a *Peumus boldus benth* apresentou em uma de suas cepas certo poder antifúngico sobre a *Candida tropicalis*. Os estudos feitos por Lima et al. (2006) fortalecem os experimentos obtidos no presente estudo de *Rhaphiodon echinus* pelo fato das três plantas serem da mesma família e possuírem o mesmo potencial antifúngico.

#### 4. CONCLUSÃO

Diante do que foi exposto se observa o grande potencial e eficácia do óleo essencial extraído da planta *Rhaphiodon Echinus* na ação antifúngica sobre a *Candida tropicalis*, ajudando assim no controle da resistência causada pelos medicamentos antifúngicos. No entanto, ainda existem poucos estudos nessa área, o que revela a necessidade de se intensificar mais estudos sobre o assunto.

#### Referências

MENEZES E. A. et al. Frequência e atividade enzimática de *Candida* spp. na cavidade oral de pacientes diabéticos do serviço de endocrinologia de um hospital de Fortaleza-CE. *J Bras Patol Med Laborat*, v. 43, n. 2 p. 241-4, 2007.

MARTINS NETO M, DANESI C.C, UNFER D.T. Candidíase bucal revisão da literatura. *Saúde*. 2005;31(1 e 2):16-26.

DALAZEN, D.; ZANROSSO, D.; WANDERLEY, L.; da SILVA, N.L.; Fuentesfria, A.M. Comparação do perfil de suscetibilidade entre isolados clínicos de *Candida* spp. orais e vulvovaginais no sul do Brasil. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* **2011**, *47*, 33–38.

SILVA, C. R. G., MELO, K. E. D., LEÃO, M. V. P., RUIS, R., & Jorge, A. O. C. (2008). Presença de *Candida* nas mucosas vaginal e bucal e sua relação com IgA salivar. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 300-305.

CAVASSANI V.G.S, ANDRADE SOBRINHO J, Homem MGN, Rapoport A. Candidíase oral como marcador de prognóstico em pacientes portadores do HIV. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2002; 68:630-4.

GEROMINI K.V.N, RORATTO FB, FERREIRA FG, Polido PB, de Souza SGH, do Valle JS, Colauto NB, Linde GA (2012). Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas medicinais. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. (UNIPAR)* 15(2):127-132.

ABILÍO, V.M.F. et al. Atividade antifúngica de produtos naturais indicados por raizeiros para tratamento de candidíase oral. *Revista Cubana de Estomatologia* v. 51, n. 3. 2014.

LIMA I.O, OLIVEIRA R.A.G, LIMA EO, FARIAS NMP, SOUZA EL 2006b. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Rev Bras Farmacogn* 16: 197-201

MARTINEZ R. 2006. Atualização no uso de agentes antifúngicos. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 32: 449-460.

MENEZES E.A, MENDES LG, CUNHA FA. Resistência a antifúngicos de cepas de *Candida tropicalis* isoladas no Ceará. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42:354-5.

SARTORATTO A, MACHADO A.L.M, DELARMELENA C, FIGUEIRA GM, DUARTE MCT, REHDER VLG. Composição de atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas aromáticas usadas no Brasil. *Braz. J. Microbiol*. 2004; 35: 275-80.