

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* (MILL.) N. E. BROWN SOBRE CEPAS DO GÊNERO CANDIDA

René Monteiro Araújo; Alinne Sousa Barbosa; Iana Luísa de Melo Assunção; Natália Lira Messias;
Francinalva Dantas de Medeiros

Universidade Estadual da Paraíba – UEPB

Laboratório de Desenvolvimento em Ensaio de Medicamentos – LABDEM

E-mail: renemonteiro.pb@gmail.com

RESUMO

Das 200 espécies que compõem o gênero *Candida*, apenas 20 tem demonstrado associação com casos de infecção em humanos sendo que, dessas 20, *Candida albicans* apresenta-se como principal patogênica, apesar de estudos comprovarem casos de infecção por meio de outras espécies do gênero. Aproximadamente 20-40% dos indivíduos normais apresenta colonização da via oral por espécies do gênero *Candida*, prevalecendo *C. albicans*, sendo que em casos de imunossupressão, o indivíduo poderá desenvolver a doença. Existem diversos fármacos disponíveis para o tratamento da candidíase oral, sendo que a nistatina é o medicamento de primeira escolha, porém, além de seus conhecidos efeitos colaterais, a nistatina não apresenta ação residual considerável, o que prejudica a eficiência do tratamento. Assim, tendo em vista os problemas apresentados pelo tratamento convencional, surge a necessidade de se incluir na clínica médica novos tratamentos que se mostrem mais eficazes do que os existentes. Como possível alternativa, está a pesquisa com plantas medicinais e o posterior desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos, sendo que o semiárido nordestino mostra-se como uma região composta por uma vegetação pouco estudada, mas com bastante recursos à oferecer. O óleo essencial de *Lippia alba* foi obtido e posteriormente utilizado no ensaio de atividade antifúngica, por microdiluição, objetivando determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo. Os resultados indicam que o óleo essencial da planta em questão possui potencial considerável para o desenvolvimento futuro de um medicamento fitoterápico, uma vez que obteve significativa ação contra as cepas testadas, sendo *C. krusei* e *C. tropicalis* consideradas as mais sensíveis.

Palavras-chave: *Candida*; Óleo essencial; *Lippia alba*; Concentração inibitória mínima; Fitoterápico.

INTRODUÇÃO

Aproximadamente 200 espécies compõem o gênero *Candida*, mas apenas 20 tem demonstrado associação com casos de infecção humana, sendo que sua identificação à nível de espécie se dá através da análise de suas características morfológicas e perfis bioquímicos (BENNETT, 2009). Destas, as consideradas de interesse clínico são: *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae*. (COLEMAN et al., 1998).

Cerca de 20-40% dos indivíduos normais apresenta colonização da via oral por espécies do gênero *Candida*, sendo que, entre as 20 espécies patogênicas, *Candida albicans* é a mais prevalente, sendo responsável por mais de 90% dos casos encontrados (VANDEN ABBEELE et al., 2008). Portanto, são conhecidos sua patogenicidade e fatores de virulência, incluindo sua capacidade de se aderir à membranas e mucosas, sua termotolerância, bem como produção de enzimas (HILLER et al., 2011). Constitui-se como uma espécie sensível aos antifúngicos sistêmicos, porém existem relatos de casos de resistência aos azóis (BEN-AMI et al., 2011). Em casos de imunossupressão, o indivíduo poderá desenvolver a doença, constituindo-se a candidíase oral a mais prevalente infecção

oportunistas em pacientes portadores de AIDS, sendo considerada ainda marcador de progressão de portadores dessa síndrome (JOHNSON et al., 2010).

Dentre as manifestações clínicas apresentadas pela candidíase oral, disfagia, odinofagia e queimação retroesternal são as principais, podendo ainda haver complicações que incluem hemorragia e perfuração (THOM et al., 2006)

Em virtude de várias outras doenças oportunistas que podem afetar a cavidade oral o diagnóstico a candidíase em pessoas portadoras de AIDS é feito através de investigação laboratorial, avaliando-se alterações morfológicas nas lesões, obtenção de amostras para cultura e biópsia dos tecidos (SUGAR, 2004).

Como forma tratamento, diversas opções estão disponíveis, entre elas miconazol, clotrimazol, cetoconazol e imidazol, aplicados localmente, porém tem uso limitado por apresentarem potencial risco de efeitos colaterais como, por exemplo, vômitos e diarreia. Outros fármacos pertencentes à classe dos azóis também estão disponíveis, clotrimazol e cetoconazol são exemplos. A nistatina é o agente mais utilizado no tratamento da candidíase oral, estando disponível sob a forma de suspensão oral e, além dos efeitos colaterais (náuseas,

vômito e diarreia) esta apresentação não exibe ação residual considerável (COLOMBO et al., 2003; DIGNANI et al., 2003).

Diante dos problemas apresentados pelos tratamentos convencionais surge a necessidade de novos tratamentos, que não apresentem os inconvenientes apresentados pelas drogas disponíveis no mercado. Nesse contexto, as plantas medicinais vem como possíveis alternativas ao tratamento das mais diversas enfermidades, tendo seu uso bastante difundido no Brasil, muitas vezes em decorrência da utilização na cultura popular, fazendo com que a fitoterapia seja uma terapêutica bastante adotada nos dias de hoje, sendo reconhecida pela Organização Mundial e Saúde (OMS) desde 1978 (VEIGA, 2008).

A região semiárida do nordeste é composta por uma vegetação fonte de muitos recursos, porém é pouco estudada, apesar da grande diversidade. No entanto, essa situação começa a mudar à medida que os pesquisadores começaram a perceber o potencial dessa região e, assim, realizar mais estudos, tendo em vista o suprimento das necessidades da população. Muitas espécies de plantas da Caatinga são conhecidas, amplamente utilizadas na medicina popular e, ainda, na produção de comercial de medicamentos fitoterápicos em decorrência de

sua comprovada ação antifúngica (ALBUQUERQUE et al., 2007).

Lippia alba (Mill.) N. E. Brown pertence à família Verbenaceae, conhecida popularmente como erva-cidreira utilizada na medicina popular (CORRÊA et al., 1992). O gênero *Lippia* consiste em 200 espécies amplamente distribuídas na América do Sul, América Central e África (Zoghbi et al., 1998). No Brasil, ocorre praticamente em todas as regiões, entre as propriedades atribuídas a espécie destaca-se as ações antiespasmódica, antipirética, antiinflamatória, enemagoga, diaforética, analgésica e sedativa. Tais propriedades devem-se aos seus constituintes ativos, dentre eles o óleo essencial (JULIÃO et al., 2003).

A composição do óleo essencial de uma planta é determinada geneticamente, sendo geralmente específica para um determinado órgão e característica para o seu estágio de desenvolvimento (SIMÕES et al., 2002), mas as condições ambientais são capazes de causar variações significativas, dando origem aos quimiotipos ou raças químicas tão frequentes em plantas ricas em óleos essenciais. Significando que as diferenças na composição dos diferentes quimiotipos da espécie *L. alba* não constituem um produto só da influência de fatores ambientais, mas refletem também a variação

genotípica destas plantas (TAVARES et al., 2005).

Assim, esse estudo objetivou avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown contra cepas do gênero *Candida*.

METODOLOGIA

AMOSTRAS

Foram coletadas folhas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Erva Cidreira) nos municípios de Ingá e Lagoa Seca, localizados na região semiárida paraibana. As coletas foram realizadas no período da manhã. A amostra foi identificada pelo prof. José Iranildo Miranda de Melo, com exsicata depositada no herbário Emanuel Arruda Câmara (ACAM) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), com registro N° 833.

OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial de *L. alba* foi extraído das folhas da planta utilizando-se o método de hidrodestilação em aparelho de Clevenger, por um período de 1 hora e 30 minutos, após a ebulição. Foram utilizados 200g de folha fresca em 1000 mL de água destilada. O óleo foi armazenado em frascos de vidro e submetido a uma temperatura de aproximadamente -10°C em *freezer* até serem estudadas.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Para a avaliação da atividade antimicrobiana foi utilizado o óleo essencial, obtido das folhas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, frente às cepas padrão American Type Culture Collection (ATCC) de *Candida albicans* ATCC (18804), *Candida parapsilosis* ATCC (22009), *Candida guilhermondii* ATCC (6260), *Candida tropicalis* ATCC (13803), disponibilizadas pela fundação Oswaldo Cruz, e isolado clínico *Candida albicans* (LM P20).

A atividade antimicrobiana foi verificada pelo método de microdiluição em caldo, determinando-se a concentração inibitória mínima (CIM) do óleo frente aos microrganismos citados. O ensaio foi realizado pelo método da microdiluição em caldo, em microplacas de 96 cavidades, de acordo com o preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009). O controle positivo utilizado foi a nistatina e o controle negativo as soluções hidroalcoólicas utilizadas na produção do extrato, bem como o DMSO (Dimetilsulfóxido), solvente utilizado para a solubilização do extrato e para a diluição do óleo. Os inóculos fúngicos foram padronizados conforme descrito na Farmacopéia Brasileira 5ª edição (2010) e adicionados aos poços. As placas foram

incubadas a $25 \pm 0,5$ °C, por 48 horas. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração do extrato que inibiu o crescimento microbiano visível, confirmado pelo corante resazurina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 01: Atividade antifúngica do óleo essencial de *L. alba* frente a cepas de *Candida* spp.

Amostra	CIM (g/mL)				
	C. a1	C. a2	C.p	C.k	C.t
OE2	NA	NA	0.5	0.0078	0.0156
OE3	0.75	0.1875	0.75	0.0117	0.0117

OE2: óleo essencial a 2 mg/mL; OE3: óleo essencial a 3 mg/mL; C. a 1: *Candida albicans* clínica; C. a 2: *Candida albicans* ATCC; C. p: *Candida parapsilosis* ATCC; C. k: *Candida krusei* ATCC; C. t: *Candida tropicalis* ATCC.

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que o óleo essencial de *Lippia alba* apresenta excelente eficácia na inibição do crescimento das leveduras submetidas ao ensaio. A atividade do óleo essencial da *L. alba* já foi confirmada contra patógenos humanos, como *Candida albicans*, *C. guilhermondi*, *C. parapsilosis*, *C. neoformans* e *Trichophyllum rubrum*, em estudo realizado por Oliveira e colaboradores (2006). Já Duarte e colaboradores (2005) referiram a atividade

antifúngica do óleo essencial da *Lippia alba*, inibindo o crescimento da espécie *Candida albicans*, principal patógeno relacionado à casos de candidíase oral.

Sazonalidade e condições climáticas são fatores determinantes para a obtenção de bons resultados, quando se trabalha com plantas. Segundo Corrêa (1992), o aroma da planta está relacionado aos constituintes predominantes na essência, os quais podem variar qualitativa ou quantitativamente em função de diversos fatores, tais como: estações do ano, época de floração, idade da planta, quantidade de água circulante resultante da precipitação e fatores geográficos e climáticos.

Tavares e colaboradores (2005) relataram em seu estudo que os componentes citral, carvona e linalol do óleo essencial de *L. alba* apresentaram uma rápida diminuição no período de floração da planta, auxiliando, desse modo na definição do período correto para sua coleta, sem houver perda de seus constituintes químicos, contribuindo para resultados promissores em pesquisa.

CONCLUSÕES

É possível observar que o óleo essencial de *Lippia alba* apresentam notória ação antifúngica frente às cepas testadas. Primeiramente vale salientar que os resultados

obtidos do óleo não são definitivos para o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico contendo o óleo essencial obtido a partir das folhas de *Lippia alba* para o tratamento da candidíase.

REFERÊNCIAS

BENNETT, R.J. A *Candida*-based view of fungal sex and pathogenesis. **Genome Biol.** 10:230, 2009.

COLEMAN, D.C.; RINALDI, M.G.; HAYNES, K.A. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. **Med Mycol.** 1:156–65, 1998.

VANDEN ABEELE A.; de MEEL H.; AHARIZ, M.; PERRAUDIN, J.P.; BEYER, I.; COURTOIS, P. Denture contamination by yeasts in the elderly. **Gerodontology.** 25:222–8, 2008.

HILLER, E.; ZAVREL, M.; HAUSER, N. Adaptation, adhesion and invasion during interaction of *Candida albicans* with the host-focus on the function of cell wall proteins. **Int J Med Microbiol.** 301:384–9, 2011.

BEN-AMI, R.; GARCIA-EFFRON, G.; LEWIS, R.E. Fitness and virulence costs of *Candida albicans* FKS1 hot spot mutations associated with echinocandin resistance. **J Infect Dis.** 204:626–35, 2011.

JOHNSON, N.W. The mouth in HIV/AIDS: markers of disease status and management challenges for the dental profession. **Aust Dent J.** 1:85–102, 2010.

THOM, K; FORREST, G. Gastrointestinal infections in immunocompromised hosts. **Curr Opin Gastroenterol.** 22:18–23, 2006.

SUGAR, A.M. Oropharyngeal candidiasis. **AIDS Read.** 14:572, 2004.

COLOMBO, A.L. GUIMARÃES, T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. **Rev Soc Bras Med Trop.** 36:599–607, 2003.

DIGNANI, M.C.; SOLOMKIN, J.S.; ANAISSIE, E. CANDIDA. In: ANAISSIE E.; MCGINNIS, M.R.; PFALLER, M.A. editors. **Medical mycology.** 195–239, 2003.

VEIGA Jr., V.F. Estudo o consumo de plantas medicinais na região Centro-Norte o estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais e saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** 18 (2): 308–303, 2008.

ALBUQUERQUE, U.P.; MEDEIROS, P.M.; ALMEIDA, A.L.S.; MONTEIRO, J.M.; NETO, E.M.F.L.; MELO, J.G.; SANTOS, J.P. Medicinal plants of the *caatinga* (semi-

arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology** 114:325–354, 2007.

CORRÊA CBV. Contribuição ao estudo de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex Britt. & Wilson erva-cidreira. **Rev Bras Farm** 1992; 73:57-64.

ZOGHBIET MDGB, Andrade EHA, Santos AS, Silva MHL, Maia JGS. Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown growing wild in the Brazilian Amazon. **Flav Frag J** 1998; 13:47-8.

JULIÃO LS, TAVARES ES, LAGE CLS, LEITÃO SG 2003. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (erva cidreira). **Rev Bras Farmacogn** 13: 36-38.

TAVARES, E. S.; Julião, E. S.; Lopes, H. D.; Bizzo, H. R.; Lage, C. L. S.; Leitão, S. G. (2005). Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Rev. Bras. Farmacogn.**

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute: Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana: 15° Suplemento Informativo, v. 38, n. 2, p. 111-116, 2009.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. C.; SANTOS, S. S.; BIZZO, D. H. R.; LOPES,

D.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S.; LEITÃO, S. G.. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximina, **Brazil. J. Ethnopharmacol**, 2006.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELENA, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol**, 2005.

TAVARES, E. S.; Julião, E. S.; Lopes, H. D.; Bizzo, H. R.; Lage, C. L. S.; Leitão, S. G. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Rev. Bras. Farmacogn**, 2005.