

EFEITO ANTIFÚNGICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *RHAPHIODON ECHINUS* CONTRA CEPAS DA *CANDIDA KRUSEI*

José Lucas Soares Ferreira¹; Maria Aparecida Vieira Lopes¹; Sandrielly Laís Rodrigues de Lima¹;
Gabriela Lemos de Azevedo Maia³; Abrahão Alves de Oliveira Filho²;

¹Acadêmicos do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) – Campus Patos/PB.

E-mail: jlucas_sf@hotmail.com

E-mail: sandrielly_lais@hotmail.com

Email: m.aparecidavieiralopes@gmail.com

²Professor Adjunto do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) – Campus Patos/PB.

E-mail: abrahão.farm@gmail.com

³Professor Adjunto do curso de farmacologia da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF) – Campus Petrolina/PE.

E-mail:Gabriela.lam@gmail.com

Resumo: A cavidade bucal é complexa e diversa, sendo constituída por uma variedade de espécies microbianas, dentre estas se encontram cerca de vinte gêneros fúngicos sendo oito espécies do gênero *Candida* consideradas como patogênicas causadoras da candidíase oral. As lesões de candidíase podem se apresentar de várias formas, isoladas ou múltiplas; trata-se de uma doença infectocontagiosa dependente de fatores locais, como o líquen plano, e fatores sistêmicos, como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). O tratamento contra *Candida* é feito, em principal, utilizando-se azóis, como o cetoconazol, e polienos, nistatina; entretanto, os atuais meios de tratamento estão cada vez mais obsoletos. Estas limitações terapêuticas incitam a busca por meios alternativos de tratamento abrindo portas para a utilização dos óleos essenciais, compostos derivados do metabolismo secundário das plantas. *Rhaphiodon echinus* é uma planta da família *Lamiaceae* comum do semiárido, conhecida popularmente como “flor-de-urubu”, pouco citada na literatura científica. O seu óleo essencial é amplamente utilizado na medicina popular para o tratamento de inflamações na cavidade oral, infecções no trato genitourinário e tosse. Mediante a estreita associação entre inúmeras doenças da cavidade oral e as infecções fúngicas causadas pelos micro-organismos oportunistas do gênero *Candida* aliado ao ineditismo científico desta pesquisa, esse trabalho objetivou investigar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de *Rhaphiodon echinus* para cepas de *Candida krusei* através do método de diluição seriada. Os resultados obtidos revelaram inibição das cepas de *Candida krusei* sob a ação do óleo essencial. As cepas LM 656 e LM 978, ambas com CIM de 256 µg/ML, a cepa LM 08 apresentou CIM de 512 µg/mL e a cepa LM 13 com CIM de 1024 µg/mL. Com os resultados analisados, conclui-se que o óleo essencial de *Rhaphiodon echinus* é eficaz para as cepas de *Candida krusei*, e, apesar dos resultados já apresentarem-se favoráveis para ação antifúngica isolada, testes experimentais associados à antifúngicos já comercializados são necessários.

Palavras-chave: *Rhaphiodon echinus*, *Candida krusei*, candidíase.

Abstract: The oral cavity is complex and diverse, being constituted by a variety of microbial species among these are about twenty eight of fungal genera *Candida* species considered pathogenic cause of oral candidiasis. The candidiasis lesions may present in many forms, isolated or multiple; it is an infectious disease dependent on local factors, such as lichen planus, and systemic factors, such as Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). The treatment for *Candida* is done, in the main, using azoles, such as ketoconazole, and polyenes, nystatin; However, current treatment facilities are increasingly obsolete. These therapeutic limitations encourage the search for alternative means for treating opening doors to the use of essential oils, compounds derived from the secondary metabolism of plants. *Rhaphiodon echinus* is a common Lamiaceae plant family of the Brazilian semiarid region, popularly known as "flor-de-urubu" little cited in scientific literature. Its essential oil is used in folk medicine for the treatment of inflammations in the oral cavity infections of the genitourinary tract and cough. By the close association between several oral diseases and infections caused by opportunistic microorganisms of the genus *Candida* ally scientific novelty of this research, this study aimed to investigate the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of essential oil *Rhaphiodon echinus* to strains *Candida krusei* through the serial broth dilution method. The results showed inhibition of strains of *Candida krusei* under the action of the essential oil. The LM 656 LM 978 and strains, each with 256 µg/mL MIC, LM strain 08 showed an MIC of 512 µg/mL and 13 LM strains with MIC of 1024 µg/mL. With the results analyzed, it is concluded that the essential oil *Rhaphiodon echinus* is effective for strains of *Candida krusei*, and despite the results already present themselves favorable for isolated antifungal action, experimental testing on the already marketed antifungal is recommended.

Keywords: *Rhaphiodon echinus*, *Candida krusei*, candidiasis.

1. INTRODUÇÃO

A cavidade bucal é complexa e diversa, sendo constituída por uma variedade de espécies microbianas, aproximadamente 700, e dentre estas se encontram cerca de vinte gêneros fúngicos, sendo oito espécies do gênero *Candida* consideradas como patogênicas causadoras da candidíase oral: *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida viswanathii* e *Candida glabrata* (KOTHAVADE et al., 2010).

As lesões de candidíase podem se apresentar de várias formas, isoladas ou múltiplas, sendo a mais comum a candidíase pseudomembranosa. Para seu surgimento, a candidíase depende de fatores locais, como o fumo, doenças pré-existentes na mucosa bucal, higiene precária, uso de prótese dentária, e fatores sistêmicos, como o câncer, antibioticoterapia prolongada, xerostomia, desnutrição, idade, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida e gravidez. A existência desses fatores favorece o desequilíbrio da cavidade bucal, permitindo o desenvolvimento fúngico exacerbado e invasão tecidual por estes (FAVALESSA et al., 2010; LOTFI-KAMRAN et al., 2009; ROSSI et al., 2011).

Os antifúngicos mais usados hoje para o tratamento são os azóis e os polienos. Os azóis, dentre eles o cetoconazol, fluconazol e miconazol, agem inibindo a síntese de ergosterol da membrana. Os polienos, nistatina e anfotericina B, por exemplo, ligam-se aos esteróis na membrana plasmática fúngica, resultando num extravasamento dos constituintes celulares e morte celular. (WISPELWEY, PARSONS, 2006).

O fluconazol, segundo Junior et al. (2008), é ineficaz para a espécie *Candida krusei*. Em contrapartida, outros medicamentos antifúngicos extremamente eficazes, como a anfotericina B, apresentam uso restrito pelo sua alta toxicidade, sendo a toxicidade renal o principal efeito tóxico datado desde a década de noventa (BATISTA et al., 1999).

Esse crescente aumento da resistência aos antifúngicos, além da baixa biodisponibilidade, toxicidade e limitações terapêuticas a busca por meios alternativos de tratamento torna-se mais viável e necessária, abrindo portas para a utilização dos óleos essenciais, principais compostos de uso terapêutico derivados do metabolismo secundário das plantas, que na literatura são muito estudadas para o tratamento de diferentes doenças infecciosas (SAAD, 2010; AMARAL et al., 2004).

O óleo essencial de *Rhaphiodon echinus*, por exemplo, que é uma espécie vegetal brasileira da família *Lamiaceae*, ainda pouco analisada na literatura científica, conhecida popularmente como “flor-de-urubu”, é muito utilizada na medicina popular para o tratamento de inflamações na cavidade oral, infecções no trato genitourinário e tosse (ALBUQUERQUE et al., 2007; MENEZES et al., 1998).

Mediante a estreita associação entre inúmeras doenças da cavidade oral e as infecções fúngicas causadas pelos micro-organismos oportunistas do gênero *Candida*, aliado a já estabelecida atividade antimicrobiana dos óleos essenciais oriundos de plantas, além disso, devido importância e ineditismo científico desta pesquisa, esse trabalho objetiva Investigar a atividade inibitória do óleo essencial de *Rhaphiodon echinus* para cepas de *Candida krusei*.

2. METODOLOGIA E VIABILIDADE

2.1 Ensaios in vitro

2.1.1 Substância-teste

Para os ensaios foi utilizado o óleo essencial extraído das folhas de *Raphiodon echinus*, cedido pela equipe da Prof^a. Dr^a. Gabriela Lemos de Azevedo Maia, da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF).

O óleo foi conservado em 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. E através de diluições em água destilada ou no próprio meio de cultura foram obtidas as concentrações desejadas do óleo essencial.

2.1.2 Amostras utilizadas

Foram utilizadas quatro cepas de *Candida krusei* (LM 08, LM 13, LM 656, LM 978), 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^a. Dr^a 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 foi utilizado um inóculo fúngico de aproximadamente $1 - 5 \times 10^6$ 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 e fármaco antifúngico

Foram utilizados 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. 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.

2.1.4 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, foram obtidas as concentrações de 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 e 4 µg/mL, de modo que na primeira linha da placa encontra-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, foi realizado o mesmo ensaio com o antifúngico nistatina nas concentrações de 1024 µg/mL a 4 µg/mL. Um controle de micro-organismo foi realizado colocando-se 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 utilizados na preparação da emulsão, no caso o DMSO (dimetilsulfóxido) e o Tween 80, foi feito um controle no qual foram colocados 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 para ser realizada a leitura. A CIM para o óleo essencial e antifúngico é 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. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Espécie fúngica Substância	<i>Candida krusei</i> LM 08	<i>Candida krusei</i> LM 13	<i>Candida krusei</i> LM 656	<i>Candida krusei</i> LM 978
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.

Depois da realização dos experimentos observou-se que o óleo essencial de *Rhaphiodon echinus* apresentou atividade antifúngica satisfatória para as cepas de *Candida krusei*, com as cepas LM 656 e LM 978 como mais susceptíveis à substância, ambas com CIM de 256 µg/mL. A cepa LM 08 apresentou CIM de 512 µg/mL e a cepa LM 13 com CIM de 1024 µg/mL.

Estudos de Lima et al. (2006) revelaram susceptibilidade de duas cepas de *Candida krusei* e outras cepas da espécie para o óleo essencial de outra *Lamiaceae*, a *Peumus boldus*. Entretanto, neste mesmo estudo pode-se observar que apenas uma cepa de *C. krusei* foi inibida quando sob a ação do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*, outra planta da família *Lamiaceae*.

Valentini et al. (2010) e Montanari (2010) demonstraram que o óleo essencial de *Siparuna guianensis Aublet* apresenta em sua composição espatulenol e aromadendreno, componentes observados no óleo essencial de *Rhaphiodon echinus*, e Arruda (2014) evidenciou propriedades antifúngicas por parte deste óleo essencial de *Siparuna guianensis Aublet*. Em ambos os casos acima citados, os óleos essenciais das outras plantas apresentam similaridades com óleos da *Rhaphiodon echinus*, como a composição do óleo e o parentesco das espécies, e, além disso, propriedades antifúngicas.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que o óleo essencial de *Rhaphiodon echinus* é eficaz para as cepas de *Candida krusei*. Os estudos comentados na discussão corroboram com os resultados obtidos mas incitam estudos bioquímicos dos componentes do óleo essencial de *Rhaphiodon echinus* para complementar a associação. Apesar dos resultados já apresentarem-se favoráveis para ação antifúngica isolada, testes experimentais associados à antifúngicos já comercializados são necessários, pois caso ocorra sinergismo entre a substância e o medicamento, isto pode amenizar complicações de medicamentosas como a anfotericina B, que é extremamente tóxica.

Referências

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, A. M. F.; MELO J. G.; DOS SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **J. Ethnopharmacol**, v. 114, p. 325–354, 2007.

AMARAL, J. F., SANTOS, F. A., SOUSA, F. C. F., ALMEIDA, F. (2004). Atividade antiinflamatória, antinociceptiva, e gastroprotetora do óleo essencial de *Croton sonderianus* Muell. Arg. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza;

BATISTA, J. M.; BIRMAN, E. G.; CURY, A. E. Suscetibilidade A Antifúngicos De Cepas De *Candida Albicans* Isoladas De Pacientes Com Estomatite Protética. *Rev Odontol Univ São Paulo*, v. 13, n. 4, p. 343-348, out/dez. 1999.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections. In: Lorian, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. New York: Willians & Wilkins, p. 739-788, 1991.

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

FAVALESSA, O.C.; MARTINS, M.A.; HAHN, R.C. Aspectos micológicos e suscetibilidade *in vitro* de leveduras do gênero *Candida* em pacientes HIV-positivos provenientes do Estado de Mato Grosso. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical** , v. 43, n.6 , p. 673-677, 2010.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparatibility of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**, v.11, p. 137-147, 2000.

JUNIOR, I. D. S.; SOUZA, I. A. M.; BORGES, R. G.; SOUZA, L. B. S.; SANTANA, W. J.; COUTINHO, H. D. M.; Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol, 2005, Disponível em <http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/scientiamedica/article/viewFile/1566/1169> Acesso em: 12 dez. 2008

KOTHAVADE, R. J.; KURA, M. M.; VALAND, A. G.; PANTHAKI, M. H. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. **Journal of Medical Microbiology**, v.59, n. 8, p. 873-880, 2010.

MENEZES, F.S.; KAPLAN, M.A.K.; CARDOSO, G.L.C; PEREIRA, N.A. Phytochemical and pharmacological studies on *Raphiodon echinus*. **Fitoterapia**, v. 69, n.5, p.459-460, 1998.

MONTANARI, R. M. 2010. Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de Anacardiaceae, Siparunaceae e Verbenaceae. 173f. Tese. (Doutorado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2010.

SAAD, A.; FADLI, M.; BOUAZIZ, M.; BENHARREF, A.; MEZRIOUI, N.-E.; HASSANI, L. Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. **Phytomedicine**, v. 17, n. 13, p. 1057–1060, 2010.

VALENTINI, C.M.A; RODRIGUEZ-ORTIZ, C.E; COELHO, M.F.B. *Siparuna guianensis* Aublet (negramina): uma revisão. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v.12, n.1, p. 96-104, 2010.

WISPELWEY, B.; PARSONS, C. H. Agentes antifúngicos. In: BRODY. **Farmacologia Humana**. Editores: MINNEMAN, K. P.; WECKER, L. Editores consultores: LARNER, J.; BRODY, T. M. Tradução da 4ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. Cap. 50, p. 593-602.