

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

Sandrielly Laís Rodrigues de Lima¹; Emanuelle Ferreira Alves¹; Gabriela Lemos de Azevedo Maia³; Abrahão Alves de Oliveira Filho².

¹Acadêmicos do curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

E-mail: sandrielly_lais@hotmail.com

E-mail: emanuelle-alves2013@hotmail.com

E-mail: Gabriela.lam@gmail.com

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

E-mail: abrahamo.farm@gmail.com

³Professora Adjunta do Curso de Farmacologia da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF)- Campos Petrolina-PE

Resumo: As pesquisas com produtos naturais oriundos de plantas têm aumentado com a necessidade de novas ferramentas terapêuticas para o combate das infecções fúngicas oportunistas e que vem criando resistência aos medicamentos atualmente existentes como as infecções causadas pela *Candida albicans*, uma das espécies mais patogênicas e de maior importância odontológica. Esse trabalho procura analisar a possível atividade antifúngica do óleo essencial de *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (*Lamiaceae*) sobre cepas de *Candida Albicans*. Sobre a metodologia a determinação da CIM (Concentração inibitória mínima) do óleo, foi realizada através da técnica da microdiluição em caldo. Utilizou-se as seguintes cepas de *Candida albicans* (ATCC 76645, LM 106, LM 108 e LM 111). Todas as cepas de micro-organismos utilizados neste estudo foram cedidas pelo Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, já o óleo essencial extraído das folhas de *Rhaphiodon echinus*, foi cedido pela Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF).

Foi realizado controle de viabilidade das cepas ensaiadas, e também controle de sensibilidade destas cepas ao antimicrobiano Nistatina 100 UI/mL. As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a 35°C por 24 - 48 hs e se realizou a leitura. Após a leitura e diante dos resultados analisados observou-se a real capacidade antifúngica da substância e identificou-se a concentração mínima necessária do óleo essencial da planta *Rhaphiodon echinus* para a inibição do crescimento fúngico. Para as cepas do tipo LM 106, LM 108 e LM 111 o óleo apresentou a CIM de 512 µg/ml, no entanto, para a cepa ATCC 76645 o óleo apresentou uma CIM de 1024 µg/mL.

Palavras-chave: óleo essencial *Rhaphiodon echinus* e *Candida albicans*.

Abstract: Research on natural products from plants have increased the need for new therapeutic tools to combat opportunistic fungal infections and which is creating resistance to currently available drugs such as infections caused by *Candida albicans*, one of the most pathogenic species and most important dental. This paper analyzes the possible antifungal activity of essential oil *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (*Lamiaceae*) on strains of *Candida Albicans*.

On the methodology of determining MIC (Minimum Inhibitory Concentration) of the oil it was performed using microdilution broth technique. We used the following strains of *Candida albicans* (ATCC 76645, LM 106, LM 108 and LM 111). All strains of microorganisms used in this study were provided by the Mycology Laboratory of the Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, since the essential oil extracted from *Rhaphiodon leaves echinus*, was granted by the Federal University of Vale do São Francisco (UNIVASF). Control was carried viability of the tested strains, and also control sensitivity of these strains to the antibiotic nystatin 100 IU / ml. The plates were aseptically sealed and incubated at 35 ° C for 24 - 48 hours and held reading. After reading and considering the results analyzed there was a real antifungal capacity of the substance and identified the required minimum concentration of the essential oil of *echinus Rhaphiodon* plant for the inhibition of fungal growth. For strains of type LM 106 LM 108 LM 111 and the oil showed a MIC of 512 / ml, however, strain ATCC 76645 for the oil showed a MIC of 1024 / mL

Keywords: essential oil *Rhaphiodon echinus* and *Candida albicans*

1. INTRODUÇÃO

A cavidade oral é colonizada por uma comunidade de microrganismos que constituem a microbiota residente, composta principalmente por bactérias e fungos. Conta-se hoje com mais de 700 espécies de microrganismos identificados, onde há evidências demonstrando que a microbiota pode exercer efeitos positivos e negativos sobre a saúde do hospedeiro, formando um ecossistema complexo, cujas consequências disso sobre o indivíduo serão variáveis e dependerão de fatores que influenciam o equilíbrio dinâmico entre microrganismos e hospedeiro (MAGALHÃES et al., 2005).

Candida é um gênero de fungos patogênicos do filo dos deuteromycota que podem causar doenças infecciosas, como por exemplo, a candidíase. Encontra-se, em torno de vinte gêneros e noventa espécies de leveduras isoladas e classificadas; dentre estas, oito espécies do gênero *Candida* foram consideradas patogênicas causadoras de candidíase na cavidade oral: *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida viswanathii* e *Candida glabrata*. (CASTRO et al., 2006).

Entre as espécies pertencentes ao gênero *Candida*, a *Candida albicans* é considerada como uma das mais patogênicas, bem como a espécie de maior importância odontológica, sendo que sua ocorrência neste sítio anatômico representa 20% a 60% de todos os isolados. Assim, apresenta-se como um dos agentes patogênicos mais importantes encontrados na cavidade oral (HERNÁNDEZ-SOLÍS et al., 2014).

Vários Medicamentos antifúngicos vêm sendo desenvolvidos para o tratamento da candida bucal, como os antissépticos à base de tintura de iodo, iodoquinol, violeta de genciana, ácido salicílico e benzoico, derivados sulfamídicos, corantes, quinonas e antifúngicos poliênicos (nistatina, anfotericina B). Além desses também temos os antifúngicos azóis que são: agentes do imidazol (cetoconazol, clotrimazol) e os agentes triazóis (fluconazol e Itraconazol). (NEVILLE et al., 2015; ARAÚJO et al., 2004)

Algumas dessas drogas, por serem amplamente usadas e muitas vezes administradas de maneira errada, em casos de tratamentos incompletos, tornaram-se obsoletas para alguns tipos de espécies fúngicas, por exemplo, o fluconazol onde estudo como o de Bernardes et al. (2009) mostra

que 100% das *C. albicans* foram resistentes a este antimicótico. Em contrapartida, outros medicamentos antifúngicos extremamente eficazes, como a anfotericina B administrada por via intravenosa, possui alta toxicidade, causando a disfunção renal como um dos seus efeitos colaterais mais importantes. (BATISTA et al., 1999).

As plantas com propriedades terapêuticas para o cuidado da saúde são utilizadas desde a antiguidade até os dias atuais, e vêm constituindo uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos que contem uma série de substâncias que podem ser utilizadas para os tratamentos de diferentes doenças infecciosas. Elas aparecem como parte do cuidado tradicional de saúde em muitas partes do mundo e têm despertado o interesse de vários pesquisadores. (ANDRADE, T.U. et al., 2010)

Os óleos essenciais são derivados do metabolismo secundário das plantas e constituem os elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais, que estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência do organismo.

Tais substâncias, geralmente, são agentes que apresentam atividade antimicrobiana contra um grande número de microrganismos, incluindo espécies resistentes a antibióticos e antifúngicos (CARSON et al., 1995).

Entre os óleos essenciais encontrados no Brasil destaca-se o óleo oriundo da planta *Rhaphiodon echinus*, uma espécie vegetal encontrada na Caatinga, pertencente à família da *Lamiaceae* e conhecida popularmente como flor-de-urubu. Na medicina tradicional a infusão da planta é usada no tratamento da tosse e inflamação na cavidade oral, porém o extrato aquoso desta planta demonstrou atividade anti-inflamatória e também analgésica. (MENEZES et al., 1998; TORRES et al., 2009).

Com base nas informações citadas sobre o potencial terapêutico dos óleos essenciais, e a necessidade de novas medidas de controle para as infecções fúngicas na cavidade oral devido os crescentes casos de resistência aos antifúngicos utilizados atualmente, esse trabalho procura analisar a possível atividade antifúngica do óleo essencial de *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (*Lamiaceae*) sobre cepas de *Candida Albicans*, utilizando testes e contribuindo assim para o fortalecimento do uso medicinal de plantas pela sociedade, sendo ela uma pesquisa inédita e de grande importância científica.

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 albicans* (ATCC 76645, LM 106, LM 108 e LM 111), 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. 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 albicans*, o que se observa na tabela abaixo.

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

Espécie fúngica Substância	<i>Candida albicans</i> ATCC 76645	<i>Candida albicans</i> LM 106	<i>Candida albicans</i> LM 108	<i>Candida albicans</i> LM 111
OERE (1024 µg/mL)	+	+	+	+
OERE (512 µg/mL)	-	+	+	+
OERE (256 µg/mL)	-	-	-	-
OERE (128 µg/mL)	-	-	-	-
Controle negativo	+	+	+	+
Controle positivo	-	-	-	-

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

Diante dos resultados da tabela, identificou-se a concentração mínima necessária do óleo essencial da planta *Rhaphiodon Echinus* para a inibição do crescimento fúngico. Para as cepas do tipo LM 106, LM 108 e LM 111 o óleo apresentou a CIM de 512 µg/ml, no entanto, para a cepa ATCC 76645 o óleo apresentou uma CIM de 1024 µg/mL.

Outros estudos como o de BALDUCCI et al., (2009) realizaram pesquisas sobre a *Mentha piperita* ou hortelã-pimenta, planta da família *Lamiaceae*, nas quais obtiveram resultados positivos, também comprovando a ação antifúngica da família sobre a *Candida albicans*, ratificando o intuito da pesquisa e reafirmando o seu potencial antifúngico.

4. CONCLUSÃO

Diante do que foi exposto pode-se concluir que o óleo essencial de *Rhaphiodon echinus* tem uma importante ação antifúngica sobre a *Candida albicans*, auxiliando no controle da resistência causada pelos medicamentos antifúngicos, no entanto ainda são poucos os estudos na área, daí a necessidade de intensificação de pesquisas no assunto.

REFERENCIAS

ARAÚJO, J.C.L.V.; LIMA, E.O.; CEBALLOS, B.S.O.; FREIRA, K.R.L.; SOUZA, E.L. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microorganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista Patologia Tropical**, v. 33, p. 55-64, 2004

BARCELOS, F. F. et al. Estudo químico e da atividade biológica cardiovascular do óleo essencial de folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Burt & RM Sm. em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 1, p. 48-56, 2010.

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.

CASTRO, Tito Lívio et al. Mecanismos de resistência da *Candida Sp.* Wwa antifúngicos. *Infarma*, v. 18, p. 30-35, 2006.

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.

ERNST, E. J.; ROLING, E. E.; PETZOLD, C. R.; KEELE, D. J.; KLEPSE, M. E. In Vitro Activity of Micafungin (FK-463) against *Candida spp.*: Microdilution, Time-Kill, and Postantifungal-Effect Studies. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 46, n. 12, p. 3846-3853, 2002.

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

HERNÁNDEZ-SOLÍS, Sandra E.; RUEDA-GORDILLO, Florencio; ROJAS-HERRERA, Rafael A. Actividad de la proteinasa en cepas de *Candida albicans* aisladas de la cavidad oral de pacientes inmunodeprimidos, con candidiasis oral y sujetos sanos. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 31, n. 2, p. 137-140, 2014.

MATOS, Bruno Mello de et al. Atividade antifúngica do extrato alcoólico de *Mentha piperita* sobre *Candida albicans* e *C. tropicalis*. *Rev Odontol UNESP (Araraquara)*, v. 38, p. 244-8, 2009.

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.

MOURÃO, Paulo Henrique Orlandi; MAGALHÃES, Paula Prazeres; MENDES, Edilberto Nogueira. Microbiota indígena de seres humanos. 2005.

PEREIRA, F. O.; WANDERLEY, P. A.; VIANA, F. A. C.; LIMA, R. B.; SOUSA, F. B.; LIMA, E. O. Growth inhibition and morphological alterations of *Trichophyton rubrum* induced by essential oil from *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex bor. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 233-242, 2011.

TORRES, M. C. M.; FLORÊNCIO, L. C. M.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. Chemical Composition of the Essential Oils of *Raphiodon echinus* (Nees & Mart.) Schauer. *Journal of*

Essential Oil Bearing Plants, v. 12, n. 6, p. 674-677, 2009.