

SUCETIBILIDADE *in vitro* DO EXTRATO DE INFUSÃO *Olea europaea* FRENTE A FUNGOS DO GÊNERO *Candida*

MÁRCIA KUTSCHER RIPOLL¹; STEFANIE BRESSAN WALLER²; CARLA BEATRIZ ROCHA DA SILVA³; JOSÉ RAPHAEL BATISTA XAVIER⁴; JOÃO ROBERTO BRAGA DE MELLO⁵; RENATA OSÓRIO DE FARIA⁶

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul – marciaripoll@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – waller.stefanie@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – carlabrsil@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – jraphaelxavier@outlook.com

⁵Universidade Federal do Rio Grande do Sul – jmello@gabinete.ufrgs.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – renataosoriovet@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os fungos do gênero *Candida* contemplam diversas espécies, sendo a *Candida albicans*, comensal de pele e mucosas, a de maior importância devido a seu caráter oportunista e frequente ocorrência em casos de candidose tanto em humanos quanto animais. Normalmente a causa da doença associa-se a um desequilíbrio entre os micro-organismos presentes nas mucosas comumente causado por uso de antibióticos por períodos prolongados, deficiência imunológica do hospedeiro, uso exacerbado de corticoides ou imunodeficiências decorrentes de doenças crônicas. Diversos fármacos antifúngicos são indicados no tratamento da candidose, mas apesar de possuir mais de uma possibilidade, ainda assim, o número de antifúngicos é pequeno frente a quantidade de antibacterianos disponíveis nas prateleiras de farmácias. Além da pouca disponibilidade dos fármacos temos os mecanismos de defesa fúngica que manifestam-se de diferentes formas, como desvios metabólicos, superexpressão ou alteração de alvos farmacológicos ou diminuição da concentração do fármaco (COWEN et al., 2015; NOBRE et al., 2002; LACAZ & DEL NEGRO, 1994; CRAWFORD & WILSON, 2015)

No intuito de sanar problemas de resistência aos fármacos, redução de efeitos colaterais e custo de medicamento, o conhecimento de plantas medicinais na terapêutica para tratamentos de micoses se dispõe como uma alternativa farmacológica, onde estudos que usam parte de plantas já foram realizados, comprovando a eficácia da utilização de fitoterápicos como fungicidas e/ou fungistáticos (ODDS et al., 2003; JOHANN et al., 2007; WALLER et al., 2013; KORUKLUOGLU et al., 2006).

Pertencente à família das *Oleaceae*, a *Olea europaea* é considerado um dos cultivos mais antigos e no Brasil sua produção tem destaque nas regiões Sul e Sudeste (COUTINHO et al., 2015). O fator climático no sul do Brasil agrega no sentido positivo para o cultivo das oliveiras, no qual a variação de temperatura anual fica em média de 17°C e 24°C, tornando interessante e viável o plantio, visto que a temperatura ideal para o crescimento e frutificação da oliveira está entre 10°C e 30°C (PILLAR et al., 2009; COUTINHO et al., 2009). Em sua composição possui ácidos graxos, carotenoides, tocoferóis e fenóis, os compostos fenólicos, principalmente a oleuropeína e hidroxitirosol, entre outros elementos químicos são conhecidos pela sua ação não somente antioxidante e anti-inflamatória como ação antimicrobiana (NUNES et al., 2018; EIDI et al., 2012; ALY et al., 2018).

A partir dessa perspectiva, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil sensibilidade *in vitro* de isolados de *Candida* spp. frente extrato aquoso de bagaço de *Olea europaea* L.

2. METODOLOGIA

Os testes foram realizados a partir dos extratos aquosos de oliveira em infusão por 10 minutos de sete variedades distintas (Picual, Frontoio, Koroneiki, Coratina, Arbequina, Arbosana, Manzanilla) a partir do bagaço cedido pela Estação Experimental Cascata (EEC – EMBRAPA). Foram utilizados isolados do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária (MicVet – UFPel), cinco *Candidas*, provenientes de animais que apresentavam lesões e sinais clínicos.

Para o teste de sensibilidade *in vitro*, realizou-se a técnica de microdiluição em caldo, com base no documento M27-A3 para fungos leveduriformes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), utilizando-se adaptações para fitoterápicos (NCCLS, 2002). Para utilização dos extratos, foram testados em diluições de seis vezes, sucessivas, variando a concentração de 50mg/ml a 1,56mg/ml. Essas concentrações foram previamente diluídas em meio RPMI-1640, tamponado com glicose a 2% e MOPS. Todos os testes foram realizados em triplicata em microplacas de 96 poços de fundo chato. Na coluna de letra A das microplacas colocou-se o controle negativo, para evidenciar esterilidade do meio e também do produto testado e na coluna de letra H foi disposto o controle positivo, com a finalidade de observar a viabilidade dos isolados testados. Em

seguida, colocou-se 100 µl do produto testado no poço de letra B, e realizou-se a diluição sequencial do mesmo ao longo dos poços, posteriormente adicionou-se 100 µl de inóculo diluído em RPMI-1640. As microplacas foram incubadas durante 48h na temperatura de 35°C até a leitura da concentração inibitória mínima (CIM).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato de infusão a dez minutos das sete variedades não obtiveram resultados fungicidas nem fungistáticos frente aos isolados do gênero *Candida* utilizados, o que diverge de outro estudo em que se obteve inibição frente a outros fungos, sendo eles *Candida oleophila*, *Kloeckera apiculate* e *Saccharomyces cerevisiae* (KORUKLUOGLU et al., 2006), porém utilizando outros extratos, esses provenientes das folhas de *Olea europaea*. Possivelmente a divergência deu-se pela diversidade de compostos majoritários nos extratos obtidos (MELLO, 2012). Em outro estudo avaliando eficiência de extratos aquosos de folha de oliveira diante de *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis*, observaram atividade antimicrobiana em todos os isolados, de maneira que os extratos evitaram o crescimento na menor concentração utilizada no teste (SAHIN et al., 2017). Levar em consideração o tipo de extrato é importante, pois os mesmos podem variar na constituição e quantidade de composto presente, dependente do tipo de extração utilizada. Salienta-se que de acordo com o tipo de extrato, os constituintes possuem diferentes concentrações obtendo-se diferenças de quantidade e tipo de composto explica o por quê de certos autores verificarem atividade antimicrobiana do produto enquanto outros não possuem essa atividade (CUNHA et al., 2006).

4. CONCLUSÕES

O estudo demonstra que as concentrações utilizadas do extrato de infusão a dez minutos de bagaço de *Olea europaea* não foram efetivas frente aos isolados de *Candida* spp. que foram utilizados no estudo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALY, F. M.; OTHMAN, A.; HARIDY, M. A. M. Protective Effects of Fullerene C60 Nanoparticles and Virgin Olive Oil against Genotoxicity Induced by Cyclophosphamide in Rats. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018,

2018. COUTINHO, E. F., RIBEIRO, F. C., CAPPELLARO, T. H. *Cultivo de Oliveira (Olea europaea L.)*. Pelotas – RS, 2009
- COUTINHO, E. F., JORGE, R. O., HAERTER, J. A., COSTA, V. B. *Oliveira: Aspectos técnicos e cultivo no Sul do Brasil*. EMBRAPA, Brasília – DF, 2015.
- COWEN, L. E.; SANGLARD, D.; HOWARD, S. J.; ROGERS, P. D.; PERLIN, D. S. Mechanisms of antifungal drug resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, v. 5, n. 7, p. a019752, 2015.
- CRAWFORD, A.; WILSON, D. Essential metals at the host-pathogen interface: nutritional immunity and micronutrient assimilation by human fungal pathogens. *FEMS yeast research*, v. 15, n. 7, 2015.
- CUNHA, S. C.; AMARAL, J. S.; FERNANDES, J. O.; OLIVEIRA, M. B. P.. Quantification of tocopherols and tocotrienols in Portuguese olive oils using HPLC with three different detection systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 9, p. 3351-3356, 2006.
- EIDI, A.; MOGHADAM-KIA, S.; MOGHADAM, J. Z.; EIDI, M.; REZAZADEH, S. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of olive oil (*Olea europeae L.*) in mice. *Pharmaceutical biology*, v. 50, n. 3, p. 332-337, 2012.
- JOHANN, S., PIZZOLATTI, M. G., DONNICI, C. L., RESENDE, M. A. D. Antifungal properties of plants used in Brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology*, 632-637. 2007.
- KORUKLUOGLU, M.; SAHAN, Y.; YIGIT, A.; KARAKAS, R. Antifungal activity of olive leaf (*Olea Europaea L.*) extracts from the Trilye region of Turkey. *Annals of microbiology*, v. 56, n. 4, p. 359, 2006.
- LACAZ, C. S.; DEL NEGRO, G.. Drogas antifúngicas: Terapêutica das micoses. In: *Farmacologia*. 1994. p. 1156-90.
- MELLO, L. D., PINHEIRO, M. F. *Aspécitos físico-químicos de azeite de oliva e de folhas de oliveira provenientes de cultivares do RS, Brasil*. v. 23, n 4, p. 537-548, Araraquara, 2012.
- NUNES, M. A.; COSTA, A. S.; BESSADA, S.; SANTOS, J.; PUGA, H., ALVES, R. C.; OLIVEIRA, M. B. P. *Olive pomace as a valuable source of bioactive compounds: A study regarding its lipid-and water-soluble components*. Science of The Total Environment, 644, p. 229-236, 2018.
- NOBRE, M. D. O.; NASCENTE, P. D. S.; MEIRELES, M. C. A.; FERREIRO, L. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. *Ciência rural. Santa Maria*. Vol. 32, n. 1 (jan./fev. 2002), p. 175-184, 2002.
- ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in microbiology*, v. 11, n. 6, p. 272-279, 2003.
- PILLAR, V. P.; MÜLLER, S. C.; CASTILHOS, Z. M. S.; JACQUES, A. V. A. *Campos Sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade*. Brasília, MMA. 403 p. 2009.
- ŞAHİN, S.; SAMLI, R.; TAN, A. S. B.; BARBA, F. J.; CHEMAT, F.; CRAVOTTO, G.; LORENZO, J. M. Solvent-free microwave-assisted extraction of polyphenols from olive tree leaves: Antioxidant and antimicrobial properties. *Molecules*, v. 22, n. 7, p. 1056, 2017.
- Waller, S. B., MADRID, I. M., Ferraz, V., Picoli, T., Cleff, M. B., Faria, R.O., Meireles, M. C. A., Mello, J. R. B. Cytotoxicity and anti-*Sporothrix brasiliensis* activity of the *Origanum majorana* Linn. Oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 47, p. 896-901, 2016.