

MATERIAL E MÉTODOS

4. ACTIVIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS EM *Candida albicans* e *Candida glabrata*

4.1. MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1. Fungos

Foram usadas duas estirpes isoladas de amostras clínicas respectivamente *C. albicans* e *C. glabrata*. A identificação das espécies foi realizada após cultura em Sabouraud pela prova do tubo germinativo, cultura em Agar Biggy e API 32 C.

4.1.2. Reagentes e Meios de Cultura

O Agar Biggy foi adquirido na Fluka, o Soro de Bovino Fetal é da Gibco, o Agar Sabouraud da BD, e o API 32C da bioMérieux. Todos os outros reagentes (Itraconazol, Anfotericina B e DMSO) são da Sigma.

4.1.3. Identificação

Para fazer a identificação presuntiva das leveduras em estudo realizou-se o teste do tubo germinativo, e cultura em meio de Biggy, sendo a confirmação feita através de API ID32C.

4.1.3.1. Teste do tubo Germinativo

O teste do tubo germinativo é uma técnica de identificação presuntiva que normalmente se efectua para uma rápida identificação das leveduras do género *Candida*. *C. albicans* e *C. dubliniensis* formam tubos germinativos após um período de incubação de 2 horas. O tubo germinativo é visualizado ao microscópio e aparece como uma pequena extensão lateral da levedura e não apresenta nenhum septo na base desse tubo que se forma. (Sousa *et al.*,2005)

Este teste, para as duas leveduras foi realizado num eppendorf utilizando 500 µl de soro bovino fetal onde foi feita uma suspensão, que foi incubada durante duas horas a 37° C, tendo-se posteriormente realizado uma preparação a fresco da suspensão e observado ao microscópio óptico. (Sousa *et al.*,2005)

4.1.3.2. Ágar Biggy

O meio de agar Biggy (*Bismuth sulfite, Glucose, Glycine, Yeast*) é usado para fazer cultura, isolamento e identificação presuntiva das diferentes espécies de *Candida*. (Sousa *et al.*,2005) Este meio de cultura é um meio selectivo para fungos devido ao facto de ter na sua composição sulfito de bismuto que inibe o crescimento bacteriano. O sulfito de bismuto é também um promotor do crescimento das leveduras do género *Candida*. O meio permite a identificação presuntiva de *C. albicans* pois esta espécie tem uma maior capacidade de reduzir rapidamente o sulfito de bismuto o que faz com que estas leveduras em meio de Biggy produzam colónias de cor castanha ou preta com ligeiro brilho metálico.

As duas leveduras foram semeadas assépticamente numa placa de Agar Biggy e foram incubadas a uma temperatura de 30° durante 48 horas. (Sousa *et al.*,2005)

4.1.3.3. API 32 C

O API 32 C é uma galeria que contém várias provas bioquímicas que permitem uma identificação definitiva da espécie *Candida*

Após suspensão das leveduras em água estéril ajustadas a 2 Mcfarland (Densimat, bioMérieux), são colocados 250 µl no meio de cultura API específico da galeria. A cada poço da galeria adicionam-se 135 µl de suspensão final de levedura em meio de cultura e incuba-se essa placa a 37°C.

As leituras são realizadas ao fim de 24 e 48 horas, num leitor automático de galerias API (Mini API, bioMérieux).

4.1.4. Amostras

Os óleos essenciais de origem comercial utilizados neste estudo foram: óleo essencial de Tomilho (*Thymus vulgaris thymoliferum*), Cravo-da-Índia (*Eugenia caryophyllus*), Árvore Do Chá (*Melaleuca alternifolia*), Eucalipto (*Eucalyptus globulus*), Lavanda (*Lavandula angustifolia*), Hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), da marca Doutor Valnet®, e Óleo de Amêndoas Doces (*Olio di Mendorle Dolci*) da marca Natura House®. Como controlos foram ainda testados os antifúngicos Anfotericina B e Itraconazol adquiridos na SIGMA.

4.1.5. Actividade antifúngica

Para testar a actividade antifúngica foram preparadas suspensões das duas leveduras em estudo (*C. albicans* e *C. glabrata*) com 1 Mcfarland (Densimat, bioMérieux) (1×10^6 CFU/mL) em água estéril. Estas suspensões foram preparadas a partir de culturas em agar Sabouraud com 24 h de incubação. De seguida foram preparadas suspensões em agar Sabouraud com a proporção de 100 µl de suspensão do fungo / 10 mL de agar Sabouraud. Nas placas de 96 poços de fundo plano colocaram-se 5 µl de cada uma das diluições sucessivas (1:2) de cada um dos óleos essenciais em estudo que foram previamente diluídos em DMSO e de seguida colocou-se 250 µl da suspensão do fungo em agar Sabouraud. Para a Anfotericina B foram realizadas diluições sucessivas de 1:2 em água a partir de uma solução inicial com uma concentração de 20 mg/ml em água destilada estéril. Para o Itraconazol as diluições realizadas também de 1:2 foram feitas em DMSO a partir de uma soluções inicial com uma concentração de 10 mg/ml. Os resultados foram registados após 24 h de incubação a 37°.

Foi também realizado um controlo positivo (meio de cultura inoculado; 100% de crescimento); controlo negativo (apenas meio de cultura; 0% de crescimento); brancos dos composto em estudo (meio de cultura com diferentes diluições dos compostos em estudo); e controlo do DMSO (meio de cultura inoculado com a concentração máxima utilizada de DSMO).

A Concentração Mínima Inibitória (CMI) corresponde à menor concentração testada que foi capaz de inibir o total crescimento das leveduras em estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1. Identificação

Os resultados da identificação das leveduras isoladas das amostras clínicas estão esquematizadas na tabela 2.

Tabela 2: Resultados dos testes de identificação das leveduras isoladas das amostras clínicas

	Amostra 1	Amostra 2
Teste do tubo Germinativo	Há formação do tubo germinativo (Figura 17)	Não há formação do tubo germinativo (Figura 18)
Agar Biggy	Formação de colónias castanhas	Não se aplica
API 32 C (24 horas)	68 %	66%
API 32 C (48 horas)	96 %	97%

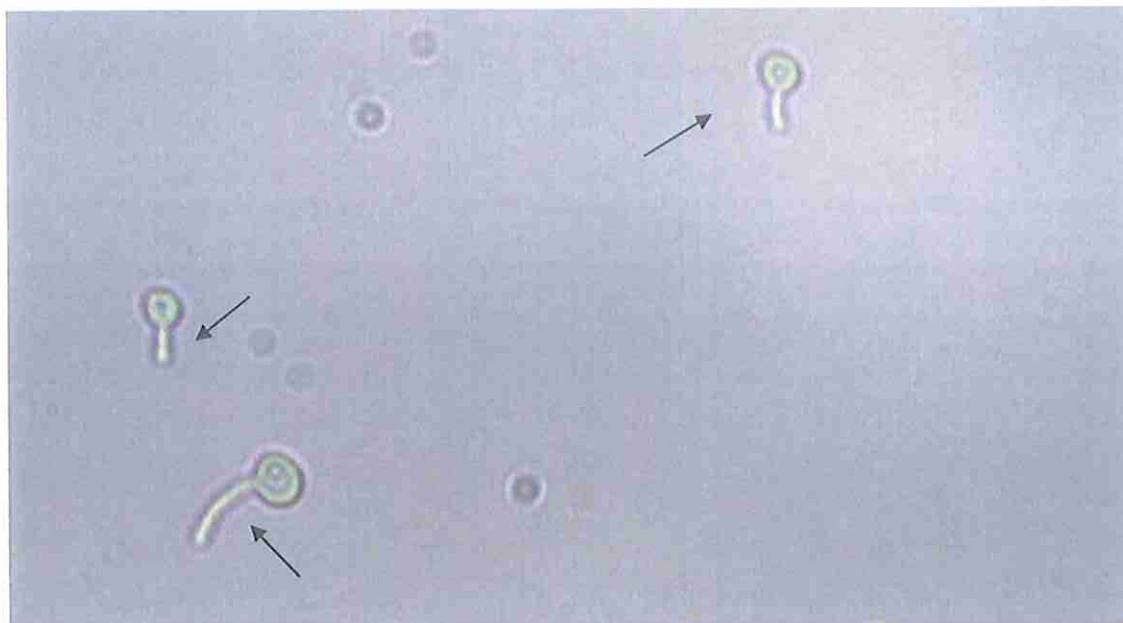


Figura 17: Resultados do teste do tubo germinativo para Amostra 1, onde se pode observar a formação do Tubo germinativo (Fotografia cedida por Cerqueira F.)

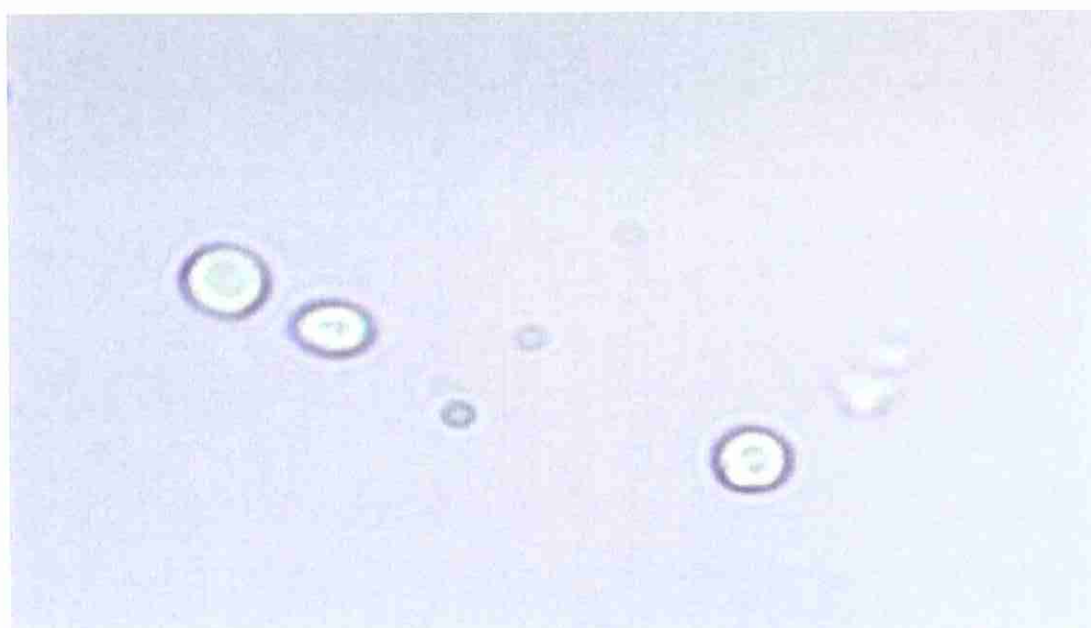


Figura 18: Resultados do teste do tubo germinativo para Amostra 2, onde se pode observar que não há formação do Tubo germinativo. (Fotografia cedida por Cerqueira F.)

Avaliação da actividade antifúngica de óleos essenciais em leveduras do género *Candida*

De acordo com os resultados positivos para o teste do tubo germinativo e Biggy para a amostra 1, confirmados por API 32 C, esta corresponder a *C. albicans*.

Os resultados negativos obtidos para o teste do tubo germinativo e Biggy para a amostras 2, confirma não se tratar de *C. albicans*. A identificação por API 32 C evidenciou tratar-se de *C. glabrata*.

4.2.2. Determinação da actividade (CMI) dos óleos essenciais

As Concentrações Mínimas Inibitórias obtidas durante a realização deste trabalho estão apresentadas na tabela 3.

Tabela 3: Concentrações mínimas inibitórias (CMI) dos óleos essenciais para *C. albicans* e *C. glabrata*.

<i>Óleo essencial</i>	CMI	
	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida glabrata</i>
Tomilho	0,30 µl/ml	0,30 µl/ml
Cravo-da-índia	0,30 µl/ml	0,30 µl/ml
Árvore do chá	>2,0 µl/ml	>2,0 µl/ml
Eucalipto	>2,0 µl/ml	>2,0 µl/ml
Lavanda	>2,0 µl/ml	>2,0 µl/ml
Hortelã-pimenta	>2,0 µl/ml	>2,0 µl/ml
Óleo de Amêndoas Doces	>2,0 µl/ml	>2,0 µl/ml
Anfotericina B	0,63 µg/ml	0,63 µg/ml
Itraconazol	>300 µg/ml	>300 µg/ml

(Resultados de três determinações. A Anfotericina B e o Itraconazol foram testados como controlos positivos.)

Após a observação de todos os resultados apresentados na tabela anterior, pode-se concluir que os óleos essenciais de Árvore do chá, Eucalipto, Lavanda, Hortelã-pimenta, e Amêndoas Doces mostram não ter capacidade de inibir as duas espécies em estudo, mesmo quando utilizados na concentração de 2,0 µl/ml.

Já os óleos essenciais de Tomilho e Cravo-da-índia, mostram ser potentes inibidores do crescimento das duas leveduras em estudo, sem qualquer tipo de preferência relativamente à espécie.

Como se pode verificar pela observação dos resultados, a actividade do Tomilho e Cravo-da-índia foi mesmo superior à da Anfotericina B, um reconhecido composto antifúngico. É ainda curioso que os óleos essenciais sejam activos em estirpes pouco sensíveis ao Itraconazol. Seria interessante estudar estas estirpes relativamente à resistência a outros triazóis, nomeadamente moléculas como o voriconazol.

CONCLUSÃO

4.3. CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de Tomilho e Cravo-da-índia apresentam-se como uma boa alternativa terapêutica para os casos de Candidose superficial, sendo mesmo possível a sua utilização em estirpes de *Candida* resistentes a alguns antifúngicos disponíveis no mercado.

Segundo Pinto 2006, óleo essencial de Tomilho demonstra ter actividade antifúngica sobre as algumas espécies de *Candida*, nomeadamente *C. albicans* e *glabrata*. O que se confirma pelos resultados obtidos com a realização do nosso estudo.

Uma das utilizações referenciadas para o Cravo-da-índia é a sua utilização para o tratamento do pé-de-atleta, um tipo de micose provocada por alguns fungos, nomeadamente espécies de *Candida*, o que pode ser comprovado pelo nosso estudo.

Para os restantes óleos essenciais estudados verificou-se que não possuem actividade antifúngica, o que pode demonstrar as limitações do espectro de acção dos diferentes óleos essenciais.

BIBLIOGRAFIA

5. BIBLIOGRAFIA

Abruzzo, G. K.; Gill, C. J.; Flattery, A. M.; (2000); Efficacy of the echinocandin caspofungin against disseminated aspergillosis e candidiasis in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice; *Antimicrob Agents Chemot*, 42, pp. 2310-2318.

Arikan, S.; Lozano-Chiu, M. , Paetznick, V. *et al*; (2001) *In vitro* susceptibility testing methods for caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. *Antimicrob Agents Chemoter*, 45, pp.327-330.

Bergold, A. M.; Georgiadis, S.; (2004). Novidades em fármacos antifúngicos: Uma revisão. *Visão Académica*, 5 (2), pp. 159-172.

Caramona, M.; Esteves, A. P.; Gonçalves, J.; Macedo, T.; Mendonça, J.; Osswald, W.; Pinheiro, R. L.; Rodrigues, A.; Sampaio, C.; Sepodes, B.; Teixeira, A. A.; (Junho de 2007). *Prontuário Terapeutico; INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde*, IP/ Ministério da Saúde.

Carrillo-Muñoz, J.; Gobernado, M. (1999). Nuevos antifúngicos. Presente y futuro. *Revista Española de Quimioterapia*, 12, pp. 181-204

Contribuidores de Wikipédia; “*Amendoeira*” *Wikipédia, a enciclopédia livre*; (2009). [Em linha]. Disponível em <http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Amendoeira&oldid=13771257> [Consultado em 16 de Março de 2009]

Contribuidores da Wikipédia, “*Árvore-do-chá*,” *Wikipédia, a enciclopédia livre*, [Em linha] Disponível em <http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=%C3%81rvore-do-ch%C3%A1&oldid=14742017> [Consultado em 11 de Junho de 2009].

Contribuidores da Wikipédia, "*Cravo-da-índia*", *Wikipédia, a enciclopédia livre*; [Em linha] Disponível em <http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Cravo-da-%C3%ADndia&oldid=14214342> [Consultado em 11 de Junho de 2009].

Contribuidores da Wikipédia, "*Óleo essencial*," *Wikipédia, a enciclopédia livre*, [Em linha]. Disponível em http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=%C3%93leo_essencial&oldid=14522768 [Consultado em 17 de Março de 2009]

Dermatology Information System. [Em Linha]. Disponível em www.dermis.net [Consultado em 25 de Abril de 2009]

Doctor Fungus. [Em Linha]. Disponível em http://www.doctorfungus.org/imageban/index_enlarge.pl [Consultado em 25 de Abril de 2009]

Doenças Sexualmente Transmissíveis. [Em Linha]. Disponível em <http://br.geocities.com/maycon.silveira/paginas/index.htm>, [Consultado em 25 de Abril de 2009]

Duarte, Marta C. T.; (2006). "Actividade antimicrobina de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil"; *Construindo a historia dos produtos naturais*, 7.

Eloff, J. N.; (1998). Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants?; *Journal of Ethnopharmacology*, 81, pp. 1-8

Ferreira, W.; Sousa, J. C. (2000). *Microbiologia Volume 2*, LIDEL.

Flattery, A.M.; Hicks, P.S.; Wilcox, A.; *et al.*; (2000). *In vitro* susceptibility of clinical trial isolates of *Aspergillus spp.* to the echinocandin antifungal caspofungin (Cancidas™, MK-0991). *Program Abstr 40th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemoter*, 936.

Franzot , S. P.; Casadevall A.; (1997); L-743,872 enhances the activities of amphotericin B and fluconazole against *Cryptococcus neoformans in vitro*; *Antimicrob Agents Chenoter*, 41, pp. 331-336.

Galarrag, B.; Ho, M.; Youssef, H.; Hill, A.; McMahon, H.; Hall, C.; Ogston, S.; Nuki, G.; Belch, J.; (2008). *Rheumatology*, 47, pp. 665-669.

Gonzalez, G. M.; Tijerina.;R, Najvar L. K.; *et al.*; (2001). Correlation between antifungal susceptibilities of *Coccidioides immitis in vitro* and antifungal treatment with caspofungin in a mouse model; *Antimicrob Agents Chemoter*, 45, pp. 1854-1859

Graybill, J. R.; (1996). Lipid Formulations for Amphotericin B: does the emperor need new clothes? *Ann Int Med*, 124, pp. 921- 923

Henriques, J. *Os Fungos: a sua vida e como influenciam a nossa...*[Em linha]. Disponível em www.naturlink.pt/canais/Artigo.asp?iArtigo=12146&iLingua=1 [Consultado em 13 de Agosto 2008].

Hortelã. [Em Linha]. Disponível em <http://muitasflores.blogs.sapo.pt/tag/pla> [Consultado em 11 de Junho de 2009]

Hosseini-Yeganeh, M.; McLachlan, A. J.; (2002). Physiologically based pharmacokinetic model for terbinafine in rats and humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, pp. 2219-2228.

Kerridge, D. Vanden Bossche, H. (1990). Drug discovery: a biochemist approach, *Handbook of experimental pharmacology. Chemotherapy of fungal diseases*. Ryley JF. Berlin-Heidelberg, Springer Verlag.

La flora – Piante naturalizzate.[Em Linha]. Disponível em <http://www.legambientearcipelagotoscano.it/biodiversita/flora/habitat/naturalizzate.htm> [Consultado em 11 Junho de 2009]

Lima, I.; Oliveira, R.; Lima, E.; Farias, N.; Souza, E.; (2006). *Actividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de Candida*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16 (2), pp. 197-201.

Manavathu, E. K., Ganesan, L. T.; Cutright J. L. *et al*; (2001); *In vitro* antifungal activity of voriconazole in two drug combination with micafungin, caspofungin and amphoterecin B.; *Abstr 41st Intersci Conf Antimicrob Agent Hemoter*, 125.

Marcelo, A.; (2000). *Brasil, Guerra biológica chega ao Amazônia* [Em linha]. Disponível em <http://www.agrisustentavel.com/ogm/t100900.htm> [Consultado em 16 de Março 2009]

Martínez, M. J.; Betancourt, J.; Alonso-González, N.; Jauregui, A.; (1996). Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. *Journal of ethnopharmacology*, 52, pp. 171-174

Moura, M.; (2006). *Os Remédios da Natureza segredos e virtudes das plantas que curam*, Selecções do Reader's Digest.

Osswald, W.; Guimarães, S.; (2004). *Terapêutica Medicamentosa e suas Bases Farmacológicas*. 4ª edição, Porto Editora

Pfaller, M.A.; Messer, S. A.; Gee S.; (1999b). *In vitro* susceptibilities of *Candida dubliniensis* isolates tested against the new triazole and echinocandin antifungal agents. *J Clin Microbiol*, 37, pp. 870-872.

Pinto, E.; Pina-Vaz, C.; Salgueiro, L.; Golçalves, M. J.; Costa-de-Oliveira, S.; Cavaleiro, C.; Palmeira, A.; Rodrigues, A. And Martins-de-Oliveira, J.; (2006). Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*, 55, pp. 1367-1373

Propriedade das plantas. [Em Linha]. Disponível em <http://rubyandpearl.spaces.live.com/Blog/cns!F9E7484C4B3E90F8!1273.entry> [Consultado em 11 Junho de 2009]

Saikia, D.; Khanuga, S.; Kahol, A.; Gupta, S.; Kumar, S.; (2001). *Current Science*, 80, pp. 1264-1266.

Santos, S.; (2006); Amphotericin B nephrotoxicity [Em linha]. Disponível em <http://pt.shvoong.com/medicine-and-health/256630-amphotericin-nephrotoxicity/> [Consultado em 09 de Julho 2008].

Sousa, J. C.; Abreu, C.; Cerqueira, F.; (2005). *Microbiologia – Protocolos Laboratoriais*; Edições Fernando Pessoa

Sutton D. A., Rinaldi M. G.; Fothergill A.W.; (2000); *In vitro* activity of the echinocandin caspofungin (MK-0991) against refractory isolates of *Candida* and *Aspergillus* species; *Abstr 41st Intersci Conf Antimicrob Agents Chemoter*, 113.

Sweet Almond Oil. [Em Linha]. Disponível em http://www.naturaltoucharomatherapy.com/index.php?cPath=2_15 [Consultado em 12 de Junho 2009]

Tomilho. [Em Linha]. Disponível em <http://users.matrix.com.br/mariabene/tomilho.htm>, [Consultado em 03 de Junho de 2009]

Vale, P. L.; (2007). *Hortelã Pimenta* [Em linha]. Disponível em http://performance.clix.pt/html/fitoterapia_desc.asp?id=390 [Consultado em 16 de Março 2009]

Vazquez, J.A.; Lynch, M.; Boikov, D.; et al (1997). *In vitro* activity of a new pneumocandin antifungal, L-743,872, against azole susceptible and resistant *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemoter*, 41, pp.1612-1614.

Vfend[®]. [Em linha] Disponível em www.pfizer.com/download/uspi_vfend.pdf [Consultado em 07/11/2008]

ANEXO 1

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS

Cerqueira F.^{1,2}, Vieira S.¹, Figueiredo P.¹, Sousa, J. C.¹

¹CEBIMED/Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal

²CEQOFFUP/CEQUIMED, Universidade do Porto, Porto, Portugal

Abstract

Objectives: Screening of natural compounds is increasing due the demand for new antifungal agents [1,2]. Essential oils are known for their use in traditional medicine as antiseptics, antibacterial and antifungal agents, among other biological activities[1-3]. The antifungal activity of seven commercial essential oils was evaluated against *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Aspergillus niger* and *A. fumigatus* as this fungi are responsible for superficial and systemic mycosis and new therapeutically options are needed for these infections.

Material and methods: The antifungal activity of the essential oils was tested by determining Minimal Inhibitory Concentration (MIC) using a microdilution assay on Sabouraud agar. All the fungi were all isolated and identified from clinical specimens.

Results: Preliminary results (Table 1) showed that clove bud and thym à thymol essential oils have a potent antifungal activity against all the fungi tested. Lavender, peppermint and tea tree essential oils only exhibited a moderate antifungal activity against filamentous fungi, and had no effect on *Candida*. Eucalyptus essential oil and sweet almond oil showed no antifungal activity. The sensibility of the fungi for commercial antifungal agents (Amphotericin B and Itraconazole) was also performed as they were isolated from clinical specimens (table 1).

Table 1. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of commercial essential oils against *C. albicans*, *C. glabrata*, *A. niger* and *A. fumigatus*.

	MIC (µg/ml)			
	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. niger</i>
Clove bud	0,3	0,3	0,2	0,4
Eucalyptus	> 5	> 5	>5	> 5
Lavender	> 5	> 5	1,6	3,1
Peppermint	> 5	> 5	1,6	3,1
Sweet almond oil	> 5	> 5	> 5	> 5
Tea tree	> 5	> 5	1,6	3,1
Thym à thymol	0,3	0,3	0,2	0,2
Amphotericin B	0,6	0,6	100	40
Itraconazole	> 10	> 10	0,3	0,03

Results from three determinations.

We concluded that essential oils might be good therapeutic alternatives for superficial mycosis treatment and that the sensibility of more fungi must be tested and active compounds identified.

References

- [1] D SAikia, S. Khanuga, A. Kahol, S. Gupta, S. Kumar, *Current Science*, 2001, 80, 1264-1266
- [2] E Pinto, C Pina-Vaz, L Salgueiro, M Gonçalves, S Oliveira, C Cavaleiro, A Palmeira, A Rodrigues, J Oliveira, *Journal Medical Microbiology*, 2006, 55, 1367-1373.
- [3] B Galarraga, M Ho, H Youssef, A Hill, H McMahon, C Hall, S Ogston, G Nuki, J Belch, *Rheumatology*, 2008, 47, 665-669.