AValiação *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia* *spp* FRENTE A LEVEDURAS DE OCORRÊNCIA NA CANDIDÍASE BUCAL.

Horácio Freitas Bomfim¹; Angélica Maria Lucchese²; Lucciano Brandão de Lima³

1. Bolsista PIBIC/CNPq, graduando em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: hfreitasb@gmail.com

2. Orientador, Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: angelica.lucchese@gmail.com

3. Co-orientador, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail:

lucciano.odonto@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: *Candida*; *Lippia* *spp*; óleo essencial.

INTRODUÇÃO

A candidíase bucal caracteriza-se pelo aparecimento de lesões superficiais ou profundas, agudas ou crônicas (CLIFF, et al., 2008) podendo ser causada por diferentes espécies do gênero *Candida*, entre elas, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* (ZEGARELLI, 1993). Trata-se de uma infecção oportunista que acomete pacientes hospitalizados, principalmente em unidades de terapia intensiva, assim como indivíduos imunosuprimidos (SIQUEIRA, et al., 2014). O tratamento consiste no uso de antifúngicos tópicos a exemplo da nistatina, ou na administração sistêmica de medicamentos como o fluconazol e a anfotericina-B (NETO; DANESI; UNFER, 2008).

A busca por novas substâncias de interesse farmacológico presentes em plantas envolve uma série de fatores, dentre eles o uso popular e a presença de metabólitos secundários com atividade biológica já comprovada (CALIXTO, 2005). O gênero *Lippia* tem uma grande importância para a flora brasileira e neotropical devido a sua representatividade e utilização econômica, como condimento e pelas suas propriedades medicinais (REIS, et al., 2014). Estudos farmacológicos das espécies de *Lippia* comprovam sua atividade antimicrobiana, antifúngica, larvicida e repelente, com destaque para os óleos essenciais (COSTA et al., 2017). Assim, notou-se a importância de avaliar a atividade antifúngica frente as espécies *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis* dos óleos essenciais das espécies de *Lippia*.

METODOLOGIA

Os óleos essenciais dos três quimiotipos de *L. origanoides* (quimiotipos ricos em carvacrol - LOC, em timol - LOT e linalol - LOL), bem como de *L. lasiocalycina* (rico em β -mirceno e E-ocimenona - LL) e *L. insignis* (rico em E-ocimenona e limoneno - LI) foram cedidos pelo Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos (LAPRON/UEFS).

Foram testadas cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 10231), *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. krusei* (ATCC 14243), *C. tropicalis* (ATCC 13803) e *C. glabrata* (ATCC 36909) cedidas pelo do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM/UEFS).

Para a preparação do inóculo foram transferidas colônias dos micro-organismos teste isoladas da placa contendo ágar Sabouraud dextrose (ASD), com 24 h de crescimento, para um tubo de vidro de 5 mL contendo 2 mL de solução salina a 0,45% estéril. Após a homogeneização por 15 s, a densidade do inóculo foi padronizada e ajustada a uma turbidez óptica da solução padrão na escala 0,5 de Mac Farland, que corresponde a aproximadamente 1×10^6 UFC/mL. Em seguida, realizou-se uma diluição 1:100 dessa suspensão em solução salina estéril a 0,45%, obtendo a suspensão de trabalho com concentração de 1×10^4 UFC/mL. Este procedimento foi realizado para cada levedura testada isoladamente.

Para o preparo das placas de determinação da concentração inibitória mínima (CIM), 90 µL de caldo Sabouraud dextrose (CSD) estéril duas vezes concentrado foram colocados em placas com 96 poços, na linha A1-A9 e na linha F10-F12 para controle de esterilidade do meio. Posteriormente, foram adicionados 90 µL de CSD uma vez concentrado nas linhas B1-B9, C1-C9, D1-D9, E1-E9, F1-F9, G1-G9, H1-H9 e na linha E10-E12 sendo esta última utilizada para controle de esterilidade do meio. Em seguida, foram adicionados 90 µL da emulsão dos óleos essenciais a 1% (em Tween 80 à 5%) nas linhas A1-A9, produzindo uma concentração inicial de 0,5%. Foram feitos controles para avaliar a esterilidade dos meios de cultura e dos óleos e para comprovar a viabilidade dos micro-organismos.

Em seguida, realizou-se a misturas dos óleos com o meio de cultura e alíquotas de 90 µL foram transferidas para cada um dos poços até o final da placa. Posteriormente, foram adicionados 10 µL da suspensão do micro-organismo, perfazendo um volume final de 100 µL/poço, com uma concentração final de 1×10^3 UFC/mL. Tween 80 a 5% foi avaliada para verificar se apresentava atividade frente aos micro-organismos. Nistatina 1% foi usada como controle positivo. As placas foram incubadas a 37°C por 48 h. Após o período de incubação foram adicionados em cada poço 30 µL do revelador Resazurina 0,01% (v/v). A leitura das placas foi feita após 3 horas de incubação a fim de determinar a CIM. A mudança de cor do revelador de azul para rosa/vermelho indicou crescimento microbiano.

Para determinação da concentração fungicida mínima (CFM), placas de Petri contendo ASD foram divididas em pequenos quadrantes e identificadas de acordo com a numeração dos poços das placas de CIM que inibiram o crescimento das leveduras. Nestes quadrantes foram inoculados 10 µL do conteúdo de cada poço correspondente e estas seguiram para incubação a 37°C por 24 horas. A CFM foi considerada a menor concentração que impediu o crescimento visível neste subcultivo. Todos os testes foram realizados em triplicata.

ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A tabela 01 apresenta os resultados de determinação da CIM dos óleos essenciais.

Tabela 01: Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos óleos essenciais

CEPAS	CIM						
	ÓLEOS ESSENCIAIS/CONTROLES						
	LOC	LOT	LO L	LI	LL	Tween 5%	Nistatina
<i>C. albicans</i>	0,12% (1,2 mg/mL)	0,25% (2,3 mg/mL)	R	0,12% (1,1 mg/mL)	0,25% (2,2 mg/mL)	R	<0,6 mg/mL
<i>C. glabrata</i>	0,06% (0,59 mg/mL)	0,12% (1,2 mg/mL)	R	0,06% (0,59 mg/mL)	*	R	<0,6 mg/mL
<i>C. parapsilosis</i>	0,06% (0,59 mg/mL)	0,12% (1,2 mg/mL)	R	0,12% (1,1 mg/mL)	0,12% (1,1 mg/mL)	R	<0,6 mg/mL
<i>C. tropicalis</i>	0,25% (2,3 mg/mL)	R	R	0,25% (2,2 mg/mL)	*	R	0,25 mg/mL
<i>C. krusei</i>	0,5% (4,7 mg/mL)	R	R	0,5% (4,4 mg/mL)	R	R	0,25 mg/mL

R (resistente); * (não testada); LOC (*L. origanoides* rica em carvacrol); LOT (*L. origanoides* rica em timol); LOL (*L. origanoides* rica em linalol); LI (*L. insignis*); LL (*L. lasiocalycina*)

Todas as amostras testadas apresentaram atividade frente a pelo menos duas espécies de *Candida*, com exceção da espécie LOL, que não teve atividade frente a nenhuma das leveduras testadas. O óleo essencial de LOC apresentou o melhor desempenho frente às espécies de *Candida* testadas, com atividade frente à *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* com valores de CIM de 1,2 mg/ml, 0,59 mg/ml e 0,59 mg/ml, respectivamente.

Duas das espécies de *Candida* (*C. tropicalis* e *C. krusei*) apresentaram maior resistência aos óleos testados e a nistatina, sendo ambas resistentes a LOT e LOL. O óleo essencial de LL também não foi capaz de inibir o crescimento microbiano nas concentrações avaliadas frente *C. krusei*. A espécie *C. glabrata* foi a que apresentou menor resistência às emulsões testadas.

Os resultados da determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) estão representados na tabela 02.

Tabela 02: Determinação das Concentrações Fungicidas Mínimas (CFM), das emulsões de óleos essenciais de espécies de *Lippia*.

<i>Candida SPP</i>	CFM						
	Óleos essenciais/controles						
	LOC	LOT	LOL	LI	LL	Tween 5%	Nistatina
<i>C. albicans</i>	0,5%	>0,5%	R	0,5%	>0,5%	R	<0,6 mg/mL
<i>C. glabrata</i>	0,25%	0,5%	R	0,5%	*	R	<0,6 mg/mL
<i>C. parapsilosis</i>	0,25%	0,5%	R	>0,5%	>0,5%	R	<0,6 mg/mL
<i>C. tropicalis</i>	>0,5%	R	R	>0,5%	*	R	0,25 mg/mL
<i>C. krusei</i>	>0,5%	R	R	>0,5%	R	R	0,25 mg/mL

R (resistente); * (não testada); LOC (*L. origanoides* rica em carvacrol); LOT (*L. origanoides* rica em timol); LOL (*L. origanoides* rica em linalol); LI (*L. insignis*); LL (*L. lasiocalycina*)

Os óleos testados apresentaram atividade fungistática frente à espécie *C. albicans* nas concentrações determinadas nos testes de CIM, sendo necessárias concentrações no mínimo duas vezes maiores que a concentração inibitória mínima para ter uma ação fungicida.

Os constituintes majoritários como carvacrol, timol e limoneno são substâncias com conhecida atividade antimicrobiana e comumente encontradas nos óleos essenciais de *Lippia* (COSTA, 2017), entretanto a contribuição das substâncias minoritárias presentes não pode ser descartada devido ao efeito sinérgico.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O óleo essencial do quimiotipo de *L. origanoides* rico em carvacrol e o de *L. insignis* foram os mais ativos frente as cepas de *Candida*. Já o óleo essencial de *L. origanoides* rico em linalol foi o único que não apresentou atividade antifúngica frente a nenhuma das cepas avaliadas. Como os óleos essenciais dos quimiotipos de *L. origanoides* apresentaram variações na sua atividade antimicrobiana, é importante destacar a importância de se conhecer os quimiotipos da região, em especial de espécies utilizadas pela população, pois a modificação da composição química pode influenciar na atividade biológica.

REFERÊNCIAS

- CAVALCANTI Y W, ALMEIDA L F D, PADILHA W W N. Atividade Antifúngica de Três Óleos Essenciais Sobre Cepas de *Candida*. **Rev Odontol Bras Central**; 2011.
- CLIFF, P. R, et al. Use of multilocus sequence typing for the investigation of colonisation by *Candida albicans* in intensive care unit patients. **Journal of Hospital Infection** p. 24, 2008.
- CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—6 Ed. CLSI document M7-A6 (ISBN 1- 56238-486-4). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087- 1898 USA. 2003.
- COSTA, P. S., et al. Atividade antimicrobiana e potencial terapêutico do gênero *Lippia sensu lato* (Verbenaceae). **Hoehnea**, v. 44, n. 2, p. 158-171, 2017.
- NETO, M. M; DANESI, C. C.; UNFER, D. T. Candidíase Bucal. **Saúde**. v. 31, p. 16-26, 2005.
- REIS, A. C., et al. *Lippia alba* (Verbenaceae): A New Tropical Autopolyploid Complex. **American Journal of Botany**, p. 1002-1012, 2014.
- SIQUEIRA, J. da S. S., et al. Candidíase oral em pacientes internados em UTI. **Revista Brasileira de Odontologia**. Rio de Janeiro, v. 71, n. 2, p. 176-9, 2014.
- ZEGARELLI, D. **Fungal infections of the oral cavity**. Otolaryngologic Clinics of North America 26:1069-1088, 1993.