
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Peumus boldus* (MONIMIACEAE) FRENTE À LEVEDURA DA ESPÉCIE *Candida albicans*

EVALUATION OF THE ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL ANTIFUNGAL *Peumus boldus* (MONIMIACEAE) FACING THE YEAST SPECIES *Candida albicans*

Camila Zander Santos¹, Vanessa Barbosa Bobek², Eduardo Pietruchinski¹

¹Centro de Ensino Superior dos Campos Gerais, Departamento de Farmácia, Ponta Grossa – PR.

²Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmácia - UFPR, Curitiba-PR.

Email: vanessabarbosa273@bol.com.br

RESUMO:

Nas últimas décadas, inúmeros estudos vêm sendo realizados para conferir as plantas seu real valor e eficácia terapêutica. Os produtos oriundos de vegetais de uso medicinal com propriedades antifúngicas tornam-se uma nova alternativa no tratamento contra infecções fúngicas. A disponibilidade de antifúngicos atualmente utilizados na clínica é relativamente pequena, sendo algumas vezes ineficiente e com toxicidade elevada. O surgimento de resistência a determinadas drogas, reforça a demanda por novas alternativas terapêuticas. A busca por novos alvos, o entendimento dos mecanismos de virulência, bem como os de resistência microbiana são fundamentais diante do quadro atual. Neste contexto, o presente estudo visou avaliar “*in vitro*” a atividade antifúngica do óleo essencial de *Peumus boldus* sobre cepa da espécie *Candida albicans*. O óleo essencial foi obtido através da técnica de hidrodestilação. O ensaio antifúngico foi realizado pelo método de macrodiluição em tubos. O óleo apresentou atividade antifúngica inibindo o crescimento de *Candida albicans* em uma CIM de 0,25% v/v. Conclui-se assim que o óleo essencial de *Peumus boldus* possui boa atividade antifúngica, sendo eficaz na inibição do crescimento de leveduras da espécie *Candida albicans*.

PALAVRAS-CHAVE: Óleo essencial, *Peumus boldus*, *Candida albicans*, atividade antifúngica.

ABSTRACT:

In recent decades, numerous studies have been performed to give the plants their real value and therapeutic efficacy. Products derived from plants of medicinal use with antifungal properties become a new alternative in the treatment against fungal infections. The availability of antifungal drugs currently used in the clinic is relatively small, and are sometimes inefficient and high toxicity. The emergence of resistance to certain drugs, increases the demand for new therapies. The search for new targets,

understanding the mechanisms of virulence, as well as microbial resistance are essential before the current frame. In this context, the present study evaluated "in vitro" antifungal activity of the essential oil *Peumus boldus* strain on the species *Candida albicans*. The essential oil was obtained by hydrodistillation technique. The antifungal assay was performed by the macrodilution tubes. The oil showed antifungal activity by inhibiting the growth of *Candida albicans* in a MIC of 0.25% v/v. It follows therefore that the essential oil *Peumus boldus* has good antifungal activity and is effective in inhibiting the growth of yeast of the species *Candida albicans*.

KEYWORDS: Essential oil, *Peumus boldus*, *Candida albicans*, antifungal activity.

1. INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas produzidas por leveduras vêm crescendo, sendo que na década de 90 as espécies de *Candida* foram as responsáveis pela maioria das infecções nosocomiais. Universalmente, se aceita *Candida albicans* como o principal patógeno, mas podem existir saprofiticamente com outras espécies de *Candida*, na pele, unhas, mucosas, etc (BECK-SAGUÉ, JARVIS, 1993). Pode produzir também infecções sistêmicas em pessoas predisponentes, comumente pacientes com o sistema imunológico comprometido ou que foram submetidos a tratamento prolongado com antibióticos (ZHANG et al., 2002).

O tratamento das infecções fúngicas baseia-se numa ação sobre o agente etiológico, através de mecanismos essenciais para a sua sobrevivência. A utilização de agentes antifúngicos necessita de alguns critérios, devido ao pequeno número disponível no mercado e toxicidade de seus compostos.

Visando obter novos compostos com propriedades antimicrobianas, principalmente contra fungos, inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de obter princípios ativos contidos nas espécies vegetais, para uma possível aplicação terapêutica frente a infecções microbianas, acarretando menos efeitos tóxicos. Dentro deste contexto, mostrou-se oportuno testar a atividade antifúngica do óleo essencial de *Peumus boldus*, visto que os estudos que englobam suas atividades antimicrobianas estão restritos as bactérias e em relação aos fungos há poucos estudos.

Peumus boldus Molina pertence à família *Monimiaceae*, originária de regiões montanhosas do Chile, sendo conhecida popularmente como boldo ou boldo-do-chile (SCHWANZ et al., 2008). As folhas do boldo são utilizadas sob a forma de chás e infusões. Popularmente são utilizadas como: colagogo e colerético, diurético, digestivo, hepatoprotetor, analgésico, laxante, tratamento da dor de cabeça, da dor de ouvido, congestão nasal, dor de garganta, sedativo e hipnótico (SPEISKY, CASSELS, 1994).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Foram adquiridas as folhas secas e inteiras de *Peumus boldus* através do comércio A Gondola Ltda. (São Paulo). A espécie veio acompanhada de um boletim técnico, contendo as informações de origem, parte utilizada, colheita (mês/ano), método de secagem e aspecto macroscópico.

2.2 Obtenção do óleo essencial de *Peumus boldus*

A extração do óleo essencial foi realizada por meio da técnica de hidrodestilação, utilizando o aparelho de Clevenger, por um período de três horas. Decorrido o tempo da extração, foi realizada a leitura do volume do óleo essencial diretamente na escala volumétrica do tubo separador do aparelho de Clevenger e, posteriormente foi calculado o seu rendimento pela equação $T\%(v/p) = \text{volume da essência (mL)} \times 100(g) / \text{quantidade do vegetal em gramas}$.

O óleo resultante foi coletado e acondicionado em frasco de vidro âmbar sendo armazenado sob refrigeração até o momento do uso.

2.3 Ensaios

Em um frasco estéril foi adicionado 1,6 mL do óleo essencial, 0,04 mL de Tween 80 e quantidade suficiente para 10 mL de água destilada estéril, obtendo-se uma concentração final de 16% do óleo essencial.

Foi selecionada para o estudo, uma cepa padrão de *Candida albicans* (ATCC 10231) sendo adquirida da Newprov® Produtos para Laboratório Ltda. e mantidas armazenadas conforme orientação do fabricante.

O meio utilizado nos ensaios biológicos foi o ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (Newprov® Produtos para Laboratório Ltda.).

A levedura de *Candida albicans* foi ativada em caldo BHI (Brain Heart Infusion), deixando em estufa por 24 horas a uma temperatura de 37°C. Após esse tempo realizou-se o repique em placa de Petri contendo meio de cultura ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol, ficando em estufa por 24 horas a uma temperatura de 37°C.

O inóculo foi preparado seguindo normas da CLSI (Clinical Laboratory and Standards Institute): escolheu-se colônias de aproximadamente 1 mm de cultura de 24 horas de *Candida albicans*, essas colônias foram suspensas em 5 mL de solução salina estéril a 0,9%. A suspensão resultante foi colocada em agitador Vortex (BIOMIXER QL 901) por 15 segundos e a densidade ajustada com espectrofotômetro (Vitek®BioMeurieux),

acrescentando-se salina o suficiente para obter-se uma transmitância de 25% no comprimento de onda de 580 nm equivalente a 0,5 McFarland.

Para o controle de avaliação da atividade antifúngica, foi utilizado como padrão o antifúngico fluconazol (500 µg/mL), obtido em uma Farmácia de Manipulação de Ponta Grossa / Paraná.

2.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) – Técnica de Macrodiluição.

A determinação da CIM do produto estudado frente à *Candida albicans* foi realizada através da técnica de macrodiluição conforme padronizado pela CLSI.

Foi preparada uma série de 10 tubos de ensaio contendo 4 mL de caldo BHI em uma estante de ensaio. Em seguida foi distribuído 4 mL da solução de óleo essencial a 16% no primeiro tubo, obtendo-se uma concentração de 8%. A partir da concentração inicial foram feitas as diluições seriadas à razão 2 dos tubos 2 a 8, obtendo-se as concentrações de 0,4% a 0,125%.

Foram reservados dois tubos, sendo um para o antifúngico padrão fluconazol (500 µg/mL) que foi utilizado como controle positivo. O outro tubo foi reservado para o controle de crescimento do fungo (viabilidade da cepa), sem adição de qualquer substância, contendo apenas o meio de cultura. Em seguida adicionou-se a cada tubo 50 µl do inóculo (correspondente a 750.000 UFC).

O ensaio foi realizado em triplicata e incubado a 35-37°C durante 24 horas. Após o tempo de incubação foi realizado o repique em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e novamente incubado a 35-37°C durante 24 horas.

A leitura foi realizada visualmente, pela ausência ou presença de crescimento de *Candida albicans* através de formação de colônias. Portanto, foi determinada como CIM, a menor concentração capaz de inibir o crescimento de *Candida albicans* verificado por crescimento de colônias.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento do óleo essencial extraído por hidrodestilação das partes aéreas de *Peumus boldus* para a análise microbiológica foi de 2%, condizente com a literatura (NETO et al., 1989).

Os resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo em estudo podem ser observados na Tabela I:

TABELA I: Ação antimicrobiana do óleo essencial de *Peumus boldus*, em diferentes concentrações

| Óleo essencial (%) | <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 |
|----------------------|------------------------------------|
| 8% | - |
| 4% | - |
| 2% | - |
| 1% | - |
| 0,5% | - |
| 0,25% | - |
| 0,125% | + |
| Controle positivo | - |
| Viabilidade da cepa* | + |

+ Crescimento do microrganismo;

- Inibição do microrganismo.

*crescimento da bactéria sem adição de óleo essencial ou antibiótico padrão.

Pode-se verificar que o óleo essencial de *Peumus boldus* nas concentrações de 8%, 4%, 2%, 1%, 0,5% e 0,25%, apresentou atividade antifúngica contra levedura do gênero *Candida albicans*. Esses resultados foram compatíveis com estudos realizados, entretanto observou-se que a CIM observadas nesses estudos foi de 2%. (LIMA, FARIAS, 1999; LIMA et al, 2006)

Essa diferença de resultados pode ser devida à cepa utilizada no teste ser padrão e não selvagem, ou seja, não apresenta resistência adquirida por indução. Dessa forma mostrou-se sensível a menores concentrações do óleo quando comparado a cepas selvagens.

Em relação à particularidade do óleo essencial, sua menor ou maior atividade biológica depende de sua composição química, desta maneira serão discutidas a seguir algumas circunstâncias que podem levar a alterações em sua composição e consequentemente atividade.

Algumas pesquisas em relação a sua composição mostram que variações genéticas intraespecíficas da espécie vegetal, tratos culturais, colheita e padrões de variação geográfica (latitudes e longitudes) podem alterar a composição química dos óleos essenciais (AZEVEDO et al, 2002; APEL et al, 2006). A época e forma de plantio são um dos fatores mais importantes, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a

natureza dos constituintes ativos não é linear durante o ano. Fatores fisiológicos críticos, tais como fotossíntese, comportamento estomatal, mobilização de reservas, expansão foliar e crescimento podem ser alteradas por estresse hídrico e, conseqüentemente, levar a alterações do metabolismo secundário (GOBBO-NETO, LOPES, 2007).

A temperatura e luminosidade apresentam papel relevante, pois a interação deles garante um ambiente ideal para o processo fisiológico. Apesar das espécies terem se adaptado no seu habitat natural, elas mostram-se capazes de resistir a variações de temperatura. Estas variações são responsáveis por alterar a produção de metabólitos secundários. Os óleos essenciais, na maioria das vezes, apresentam um aumento no seu teor quando as plantas estão em ambientes com temperatura elevada, porém, em dias muito quentes, observa-se perda excessiva dos mesmos. Em relação à luminosidade, ela é um fator que influencia a concentração bem como a composição dos óleos essenciais (MORAIS, 2009).

A idade e o estágio de desenvolvimento da planta podem influenciar não apenas a quantidade de metabólitos secundários produzidos, mas a proporção relativa destes compostos. Tecidos mais jovens geralmente apresentam grande atividade biossintética, aumentando a produção de vários compostos, dentre eles, os óleos essenciais (MORAIS, 2009).

Ainda outros fatores como clima, solo, adubação, uso de agrotóxicos, irrigação, tempo e condições ambientais, proveniência do material da planta (fresco ou seco), técnica de extração, fonte botânica, afetam a composição química dos óleos, podendo provocar alterações na atividade antimicrobiana (NASCIMENTO et al., 2007).

A atividade antimicrobiana de um óleo pode ser, às vezes, bem diferente. Para uma espécie em particular, por exemplo, os valores de CIM determinados para óleos essenciais de quimiotipos de *Thymus vulgaris* diferem quando se usam outras linhagens de um mesmo micro-organismo (JANSEN et al., 1990).

Outros fatores podem afetar a CIM obtidos através de métodos de difusão e diluição, como: condições do cultivo (tempo de incubação, temperatura, taxa de oxigênio), meio de cultura, concentração das substâncias testadas, dispersão e emulsificação dos agentes utilizados na emulsão óleo-água (NASCIMENTO et al., 2007).

Os diferentes métodos utilizados para se determinar a CIM podem influenciar nos resultados. Os métodos disponíveis podem ser divididos em grupos: difusão, diluição, impedância e densidade óptica (TASSOU et al., 2000). Desses, a diluição mostrou ser o que melhor disponibiliza dados quantitativos, enquanto a difusão em placa de Petri se constitui em um método qualitativo, por isso, esses métodos (diluição e difusão) não são necessariamente comparáveis. Os resultados obtidos por cada um desses métodos podem diferir devido a fatores intrínsecos aos testes. Em suma os

resultados obtidos podem ser considerados satisfatórios, pois a CIM de 0,25% inibiu o crescimento de *Candida albicans*, resultado antes não visto em outros estudos.

No meio de controle isento de solução de óleo essencial de *Peumus boldus*, verificou-se crescimento da cepa, caracterizando sua viabilidade em caldo Sabouraud dextrose com cloranfenicol.

4. CONCLUSÃO

Considerando-se que as leveduras, principalmente as do gênero *Candida*, estão se tornando mais resistentes aos antifúngicos atualmente utilizados, a pesquisa de novos produtos com atividade antifúngica se faz necessária.

O resultado obtido no presente trabalho mostrou-se inédito, visto que a CIM obtida, de 0,25%, foi melhor do que em outros estudos, maiores ou iguais a 2%. Observou-se o potencial antifúngico que este produto vegetal possui e, futuramente poderá ser possível sua aplicação na terapêutica contra infecções fúngicas.

No entanto se fazem necessários estudos mais aprofundados quanto às características toxicológicas e ensaios clínicos para uma maior segurança do uso deste produto como medicamento.

5. REFERÊNCIAS

APEL, MA, SOBAL, M, HENRIQUES, AT. Composição química do óleo volátil de *Myrcianthes* nativas da região sul do Brasil. Rev. Bras. Farmacogn. 2006; 16(3): 402-407.

AZEVEDO, NR, CAMPOS, IFP, FERREIRA, HD, PORTES, TA, SANTOS, SC, SERAPHIN, JC et al. Essential oil chemotypes in *Hyptis suaveolens* from Brazilian Cerrado. Biochem. Syst. Ecol. 2002; 30(3): 205-216.

BECK-SAGUÉ, CM, JAVIS, WR. Secular trends in the epidemiology os nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. J. Infect. Dis. 1993; 167: 1247-1251.

GOBBO-NETO, L, LOPES, NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Quím. Nova. 2007; 30(2): 374-381.

JANSEN, AM, SCHEFFER, JJC, BAERHEIM, SA. Antimicrobial activity of essential oils from Greek *Sideritis* species. Pharmazie. 1990; 45(1): 70.

LIMA, EO, FARIAS, NMP. Atividade antifúngica de óleos essenciais, obtidos de plantas

medicinais, contra leveduras do gênero *Candida*. Rev. bras. ciênc. saúde. 1999; 3(1/3):51-64.

LIMA, IO, OLIVEIRA, RAG, LIMA, EO, FARIAS, NMP, SOUZA, EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. Res. Bras.Farmacogn. 2006;16(2):197-201.

MORAIS, LAS. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. Hortic. Bras. 2009; 27: S4050-S4063.

NASCIMENTO, PFC, NASCIMENTO, AC, RODRIGUES, CS, ANTONIOLLI, AR, SATOS, PO, BARBOSA, JAM et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. Rev. Bras. Farmacogn. 2007; 17(1):108-13.

NETO, JJ, VALENTIM, RL, MANCINI, B. Análise cromatográfica do óleo essencial do boldo do chile: determinação quantitativa. Rev. Bras. Cienc. Farm. 1989; 11:181-187.

SCHWANZ, M, NUNES, E, KONRATH, EL, VENDRUSCOLO, GS, VIGNOLI-SILVA, M, HENRIQUES, A.T et al. Caracterização farmacobotânica de *Peumus boldus* (Monimiaceae) e avaliação de atividades biológicas do alcalóide boldina. Lat. Am. J. Pharm. 2008; 27 (6): 871-900.

SPEISKY, H, CASSELS, BK. Boldo and boldine: an emerging case of natural drug development. Pharmacol. Res. 1994; 17(1): 1-11.

TASSOU, CC, KOUTSOUMANIS, K, NYCHAS, GJE. Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. Food Res. Int. 2000; 33(3/4):273-280.

ZHANG, Z, ELISOHLY, HN, JACOB, MR, PASCO, DS, WALKER, LA, CLARK, AM. Natural products inhibiting *Candida albicans* secreted aspartic proteases from *Tovomita krukovi*. Planta Med. 2002; 68 (1):49-54.