

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DAS OLIVEIRAS CONTRA FUNGOS LEVEDURIFORMES E FILAMENTOSOS

Poliheny Martins da Silva¹; Aline Rossato²; Carolina Rapachi Fortes³; Larissa da Silva Silveira⁴; Luiz Fernando Rodrigues Júnior⁵; Liana da Silva Fernandes⁶; Michele Rorato Sagrillo⁷; Matheus Dellaméa Baldissera⁸

RESUMO

O objetivo foi verificar se o extrato hidroalcoólico das oliveiras (*Olea europaea*) é capaz de evitar ou reduzir o crescimento de fungos oportunistas dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus in vitro*. O extrato foi preparado conforme a patente depositada junto ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual número BR 10 2023 015892.7. Após isso, a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada seguindo protocolos descritos pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), utilizando-se adaptações para fitoterápicos. O extrato apresentou CIM de 15 mg/mL para os fungos leveduriformes *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, bem como a mesma CIM para os fungos leveduriformes *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *grubii*. Contra os fungos *Aspergillus niger* e *A. fumigatus* a CIM encontrada foi de 30 mg/mL. Diante disso, é possível concluir que o extrato possui ação antifúngica contra fungos do gênero *Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus*.

Palavras-chave: aspergilose; *Candida albicans*; criptococose; micoses; *Olea europaea*.

ABSTRACT

The objective was to verify whether the hydroalcoholic extract from olive trees (*Olea europaea*) is capable of preventing or reducing the growth of opportunistic fungi of the genera *Candida*, *Cryptococcus* and *Aspergillus in vitro*. The extract was prepared in accordance with the patent filed with the National Institute of Intellectual Property number BR 10 2023 015892.7. After that, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined following protocols described by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), using adaptations for herbal medicines. The extract presented an MIC of 15 mg/mL for the yeast fungi *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* and *C. parapsilosis*, as well as the same MIC for the yeast fungi *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and *C. neoformans* var. *grubii*. Against the fungi *Aspergillus niger* and *A. fumigatus* the MIC was found to be 30 mg/mL. Therefore, it is possible to conclude that the extract has antifungal action against fungi of the genus *Candida*, *Cryptococcus* and *Aspergillus*.

¹ Poliheny Martins – Universidade Franciscana – polihenymartins@gmail.com

² Aline Rossato - Universidade Franciscana – aline.rossato@ufn.edu.br

³ Carolina Rapachi Fortes – Universidade Franciscana – carolinarapachi@ufn.edu.br

⁴ Larissa da Silva Silveira – Universidade Franciscana – larissa.silveira@ufn.edu.br

⁵ Luiz Fernando Rodrigues Junior – Universidade Franciscana - luiz.fernando@ufn.edu.br

⁶ Liana da Silva Fernandes – Universidade Franciscana - liana@ufn.edu.br

⁷ Michele Rorato Sagrillo – Universidade Franciscana – sagrillomr@ufn.edu.br

⁸ Matheus Dellaméa Baldissera – Universidade Franciscana – matheus.dellamea@ufn.edu.br

Keywords: aspergillosis; *Candida albicans*; cryptococcosis; mycoses; *Olea europaea*.

Eixo Temático: Atenção Integral e Promoção à Saúde (AIPS)

1. INTRODUÇÃO

Os fungos são considerados seres saprofíticos, isto é, são encontrados no solo/ambiente. No entanto, em condições favoráveis frente a um hospedeiro imunodeprimido, podem tornar-se patogênicos, causando quadros clínicos variáveis, desde processos febris a septicemias, que se não diagnosticadas e tratadas, podem ser fatais. Por definição, as micoses oportunistas são aquelas que não são capazes de causar doença em indivíduos hígidos, ou seja, indivíduos imunocompetentes. No entanto, indivíduos imunocomprometidos sistemática ou localmente, seja por doenças ou por tratamentos farmacológicos, podem vir a adquirir infecções fúngicas oportunistas. Neste sentido, doenças de base como diabetes e câncer são condições que expõe os afetados a adquirirem infecções fúngicas oportunistas (Melo *et al.*, 2022).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes, no ano de 2017, existia 12,5 milhões de indivíduos diabéticos, cuja projeção para 2045 ultrapassa 20 milhões de afetados. Além disso, é importante relembrar que indivíduos com AIDS/HIV positivos são altamente propensos a adquirirem infecções fúngicas oportunistas, sendo característicos das formas clínicas mais graves, isto é, septicemias ou as formas disseminadas da infecção fúngica. Por fim, o uso de antimicrobianos em excesso, bem como o uso de corticoides, são condições que reduzem a imunidade do hospedeiro, fazendo que fungos oportunistas consigam estabelecer processos patológicos. Neste sentido, existem gêneros de fungos causadores de importantes infecções fúngicas oportunistas, como os fungos do gênero *Candida* (fungo leveduriforme), gênero *Cryptococcus* (fungo leveduriforme) e gênero *Aspergillus* (fungo filamentoso) (Monegro *et al.*, 2022).

As candidíases são classificadas em quatro tipos de acordo com o sítio de manifestação: superficial (afetam unhas e pelos), cutâneas (afeta a pele, também chamada de intertriginosa), mucosa (afeta boca, esôfago ou vagina) e profunda (afeta

sangue ou tecidos) (Melo *et al.*, 2022). É interessante enfatizar que o gênero *Candida* é o sexto agente causador de infecções hospitalares, sendo o quarto agente em unidades de tratamento intensivo, revelando-se como um importante fungo causador de infecções hospitalares (Monegro *et al.*, 2022). A criptococose é atualmente considerada a doença oportunista com maior morbidade e mortalidade entre os pacientes soropositivos (Rajasingham *et al.*, 2017). As excretas de aves representam uma fonte de contaminação dos ambientes domésticos e públicos pelo fungo *C. neoformans*, tornando-se um fator de risco para a ocorrência da criptococose, sendo a infecção geralmente pela inalação de esporos do *C. neoformans* presentes em poeiras contaminadas. A aspergilose é uma infecção causada por fungos do gênero *Aspergillus*, sendo o *A. fumigatus* a espécie mais comum envolvida. Esses fungos são amplamente encontrados no ambiente, especialmente em matéria orgânica em decomposição, como folhas, grãos e composto. A infecção ocorre principalmente em indivíduos com sistema imunológico comprometido, como pacientes com doenças hematológicas, transplantados ou aqueles em uso de medicamentos imunossupressores (Latgé e Chamilos, 2019).

A *O. europaea* L. (oliveira) pertence à família Oleaceae sendo uma das culturas mais antigas no mundo, concentrando sua maior produção na região do Mediterrâneo. Em 2018, a indústria do azeite teve uma produção mundial de 3,6 milhões de toneladas com alto impacto econômico em muitos países (Pontes *et al.*, 2022). No entanto, este impacto também afeta o meio ambiente, pois a produção de azeite gera uma grande quantidade de resíduos sólidos (folhas de oliveira e bagaço de azeitona). As folhas da oliveira são consideradas como resíduos do olival, que são descartadas em duas etapas: durante o processo de poda e como resultado da colheita mecânica do fruto da oliveira (Espeso *et al.*, 2021). Devido a magnitude de produção, esse subproduto deve ser reaproveitado, promovendo a economia circular. A folha de oliveira tem sido usada na medicina tradicional pois é uma fonte valiosa de compostos bioativos com ações antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana e antifúngica (Espeso *et al.*, 2021).

2. METODOLOGIA

As folhas da *Olea europaea* foram adquiridas através de um olival presente na empresa OLIV INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE AZEITES DE OLIVA LTDA localizada em Caçapava do Sul, Rio Grande do Sul. Todo processo de produção do extrato foi realizado de acordo com patente depositada no INPI sob número BR 10 2023 015892.7.

Para os testes antimicrobianos foram utilizados isolados clínicos de *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *grubi*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis*, bem como fungos filamentosos *Aspergillus niger* e *A. fumigatus*. A concentração inibitória mínima foi determinada pelo método de microdiluição em caldo utilizando placas padronizadas de 96 poços de acordo com o protocolo M27-A3 aprovado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2018). Resumidamente, meio RPMI e a substância testada na concentração de 30 mg/mL foram adicionados a todos os poços e diluições seriadas foram realizadas até atingir uma concentração de 0,468 mg/mL. Após a diluição, 10 µL de inóculo fúngico foi adicionado a cada poço e foram realizados controle positivo (inóculo e meio RPMI) e controle negativo (somente meio RPMI). As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C. O ensaio foi realizado em triplicata. A menor concentração que não apresentou crescimento fúngico foi considerada como CIM.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O extrato apresentou CIM de 15 mg/mL para os fungos leveduriformes *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, bem como a mesma CIM para os fungos leveduriformes *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *grubii*. Contra os fungos *A. niger* e *A. fumigatus* a CIM encontrada foi de 30 mg/mL. Recentemente, estudo conduzido por Martins *et al.* (2022) revelou a atividade antifúngica do extrato aquoso de *O. europaea* contra fungos leveduriformes e filamentosos, como isolados clínicos de *Candida* sp., *Sporothrix brasiliensis* e fungos

causadores de dermatofitoses (*Microsporum* sp. e *Trichophyton* sp). Esses autores revelaram que o extrato aquoso não apresentou ação antifúngica contra *S. schenckii* e fungos causadores de dermatofitoses, mas foi capaz de inibir o crescimento de *C. albicans*, resultado este similar ao observado no presente estudo. Martins *et al.* (2022) encontraram uma CIM de 25 mg/mL contra *C. albicans* da American Type Culture Collection (ATCC 14053) e do Instituto Oswaldo Cruz IOC 3691), diferente do presente estudo que revelou CIM de 15 mg/mL. É importante salientar que, de acordo com o tipo de extrato, as concentrações dos seus constituintes podem variar e essas diferenças de quantidade e tipo de composto explica o porquê da diferença de CIM. Além disso, outros fatores como características da planta, solo, umidade, colheita, e época do ano podem alterar a composição química dos extratos. Os estudos recentes indicam que o extrato das folhas de oliveira possui significativa ação contra fungos. Diversas pesquisas têm demonstrado que os compostos bioativos presentes nas folhas, como oleuropeína, hidroxitirosol e outros polifenóis, exibem propriedades antifúngicas eficazes contra uma variedade de patógenos fúngicos, incluindo espécies do gênero *Aspergillus* (Silva, 2010). Esses compostos atuam interferindo na integridade da membrana celular dos fungos, inibindo o crescimento e a proliferação dos microrganismos.

4. CONCLUSÃO

Diante disso, é possível concluir que o extrato hidroalcoólico das oliveiras possui ação antifúngica contra fungos causadores de micoses oportunistas dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus*.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e da Universidade Franciscana (UFN).

REFERÊNCIAS

- ESPESO, J. *et al.* Olive leaf waste management. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, p. 1-15, 2021.
- LATGÉ, J.-P., E CHAMILOS, G. (2019). *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, p. e00140-18.
- MARTINS, O. A. Atividade *in vitro* de extratos das variedades Arbequina e Picual de *Olea europaea* L. frente a *Candida* sp., *Microsporum gypseum* e *Sporothrix brasiliensis*. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 12, e596111234808, 2022.
- MELO, I. S. F. *et al.* *Candida* sp. a brief bibliographic review. **Revista Científica Saúde e Tecnologia**, v. 2, p. 1-11, 2022.
- MONEGRO, A.F. *et al.* Hospital-acquired infections. **StatPeals** v, 10, p. 111-134, 2022.
- PONTES, A. V. P. *et al.* Extraction optimization, biological activities, and application in O/W emulsion of deep eutectic solvents-based phenolic extracts from olive pomace. **Food Research International**, v. 161, p. 1-14, 2022.
- Rajasingham, R., *et al.* Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, 17, 873-88, 2017.
- SILVA, R. F. Infecções fúngicas em imunocomprometidos. **Mycoses**, v. 8, p. 562-567, 2010.