

## AVALIAÇÃO DO EFEITO FUNGICIDA DA ÁGUA OZONIZADA E DE PLANTAS MEDICINAIS SOBRE *Candida albicans*

G. Andreani<sup>1\*</sup>, L. Gonzales<sup>1\*</sup>, D. I. Kozusny-Andreani<sup>2\*\*</sup>, R. A. Zangaro<sup>2\*\*</sup>, L. H. Moreira<sup>2\*\*</sup>, A. B. Fernandes<sup>2\*\*</sup>

\*Curso de Medicina-UNICASTELO, Fernandópolis-SP, Brasil

\*\* Instituto de Engenharia Biomédica - Unicastelo, Parque Tecnológico de São José dos Campos, Estrada Doutor Altino Bondesan, 500, Distrito Eugênio de Melo, São José dos Campos, CEP: 12247- Associação Cidade da Ciência Tecnologia e Educação – CITÉ, Rua Machado Sidney, 160/601, Centro - Zip Code - CEP 12245-650, São José dos Campos, SP, Brasil.

e-mail: doraines@terra.com.br

**Resumo:** O objetivo do presente estudo foi verificar a eficácia de óleos essenciais e de água ozonizada no controle *in vitro* de *Candida albicans*. Foi utilizada a linhagem padrão de *C. albicans* ATCC25923. No preparo dos inóculos para os testes de susceptibilidade dos óleos essenciais foram realizados pelo método de microdiluição seguindo os protocolos do NCCLS. Neste sentido, foram determinadas a concentração inibitória mínima e a concentração fungicida mínima. Para determinação da atividade antifúngica da água ozonizada, as suspensões microbianas foram expostas ao ozônio de forma direta por meio do difusor, em temperatura controlada de 25°C, em diferentes intervalos de tempo. A eficácia da água ozonizada foi determinada pelo cultivo de amostras após o tratamento como ozônio em sabouraud ágar e incubados a 37°C por 24 – 48 horas quando as colônias foram contadas. Verificou-se que os óleos de copaíba, eucalipto e cravo da Índia apresentaram atividade fungicida em concentrações 3.3%, 12,5% e 1,8%, respectivamente, enquanto que os óleos de limão e orégano foram eficazes quando utilizados a 50%. A água ozonizada (2ppm) foi eficaz na eliminação de *C.albicans* após 15 minutos de exposição.

**Palavras-chave:** Ozônio, plantas medicinais, controle, *Candida albicans*.

**Abstract:** The aim of this study was to verify the effectiveness of essential oils and ozonated water in the *in vitro* control of *Candida albicans*. Strain of *C. albicans* ATCC25923 was used. The preparation of inocula for testing the susceptibility of essential oils were performed by the broth microdilution method following NCCLS protocols. We determined the minimum inhibitory concentration and minimum fungicidal concentration. To determine the antifungal activity of ozonated water, the bacterial suspensions were exposed to ozone directly through the diffuser, in controlled temperature of 25°C at different time intervals. The effectiveness of the ozonated water was determined by cultivation of samples after treatment as ozone on Sabouraud agar and incubated at 37°C for 24

- 48 hours when the colonies were counted. It was found that oils of copaiba, clove and eucalyptus showed fungicidal activity at concentrations 3.3%, 12.5% and 1.8%, respectively, while the lime and oregano oils were used as 50% effective. The ozonated water was effective in eliminating *C. albicans* within 15 minutes of exposure.

**Keywords:** Ozone, medicinal plants, control, *Candida albicans*.

### Introdução

*Candida albicans* é uma levedura diploide com história de dimorfismo fúngico invertido, pois enquanto outros fungos se encontram na natureza na fase miceliana e causam doenças no homem na fase leveduriforme, *C. albicans* comporta-se de modo contrário [1].

A candidíase é uma infecção fúngica oportunista, em que a lesão pode ser branda, aguda ou crônica, superficial ou profunda, e de espectro clínico bem variável [2]. A *Candida albicans* é a espécie do gênero *Candida* com maior conhecimento patogênico, devido à diversidade de fatores de virulência descobertos. [3].

*C. albicans* é naturalmente sensível a todas as drogas antifúngicas de uso sistêmico, no entanto foram registrados casos de resistência adquirida a fluconazol, cetoconazol, itraconazol e anfotericina B [4]. Em pacientes com infecções recorrentes, cepas anteriormente sensíveis passam a demonstrar perfil de sensibilidade alterado, principalmente após longa exposição do hospedeiro ao mesmo antifúngico [5].

Com base nestas informações, torna-se imperativo que terapêuticas alternativas sejam desenvolvidas com o intuito de controlar esta micose. Muitas espécies vegetais são utilizadas na produção dos óleos essenciais com potencial medicinal inibem ação de fungos leveduriformes e filamentosos [6].

O ozônio, forma triatômica do oxigênio, é uma molécula altamente reativa, porém instável, apresenta atividade microbida sobre fungos, vírus e bactérias [7,8]. A água ozonizada, quando utilizada *in vitro*, pode levar a um aumento da carga microbiana inicial, seguido

por diminuição significativa das contagens de colônias de *Candida albicans* [9]. O objetivo do presente estudo foi verificar a eficácia de óleos essenciais e de água ozonizada no controle *in vitro* de *Candida albicans*.

## Materiais e métodos

**Cepas bacterianas e preparação do inóculo** – Foi utilizada a linhagem padrão de *Candida albicans* ATCC25923. O preparo dos inóculos para os testes de susceptibilidade foram realizados de pelo método de microdiluição seguindo os protocolos do National Committee for Clinical Laboratory Standards [10]. Culturas de 24 horas em meio Sabouraud ágar (Oxoid®) foram transferidas para meio Sabouraud Broth (Oxoid®) e incubadas a 37°C por 24 horas, quando se procedeu a centrifugação (4000 rpm) por cinco minutos, em seguida o sobrenadante foi desprezado e o material precipitado ressuspenso em solução estéril de NaCl (0,5%) e novamente submetido a centrifugação. Este procedimento foi repetido cinco vezes com a finalidade de retirar os componentes do meio de cultura.

O material precipitado obtido foi ressuspenso em 10mL solução estéril de NaCl (0,5%), em seguida foram adicionados 90mL de solução de NaCl, e foram ajustadas ao tubo 0,5 da escala de Mc Farland. A partir desta solução foram realizadas diluições seriadas resultando uma concentração de  $1,5 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>.

**Determinação da concentração inibitória mínima** – A concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais foi determinada seguindo os protocolos do NCCLS (2004). A CIM foi considerada como a menor concentração do extrato capaz de inibir o desenvolvimento fúngico.

**Determinação da concentração fungicida mínima** – A concentração fungicida mínima (CFM) será determinada após determinação da CIM, os tubos contendo crescimentos visíveis ou não, foram agitados vigorosamente, em seguida 100µL da solução de cada tubo foram transferidos para placas de Petri contendo meio sabouraud ágar e incubados a 37°C por 24 h. Foi determinado o número de colônias por placa e calculada a CFM.

**Determinação da atividade antifúngica da água ozonizada** – O ozônio foi produzido por meio e um gerador corona. O oxigênio puro foi suprido via cilindro de oxigênio. O ozônio produzido de forma constante pelo equipamento foi conduzido por um tubo de silicone para o difusor, gerando assim 2ppm. As suspensões bacterianas (1000 mL) foram expostas ao ozônio de em temperatura controlada de 25°C.

Para o tratamento com ozônio a densidade celular foi ajustada para a concentração de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL de solução de NaCl (0,5%). Das amostras tratadas e não tratadas com ozônio foram coletados 0,1mL, em diferentes intervalos de tempo (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 minutos) e foram inoculadas em sabouraud agar, incubados a 37°C por 24 – 48 horas e o número de UFCs foi determinado.

**Análise dos resultados** – Os dados obtidos foram

analisados pelos testes de qui-quadrado; de Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn post-hoc.

## Resultados

Os dados apresentados na tabela 1 evidenciam diferenças significativas para CIM e CFM dos diferentes óleos essenciais. Os óleos de copaíba, eucalipto e cravo da Índia apresentaram atividade fungicida em concentrações 3,3%, 12,5% e 1,8%, respectivamente, enquanto que os óleos de limão e orégano foram eficazes quando utilizados 50%.

Tabela 1: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração mínima fungicida (CFM) de óleos essenciais sobre *Candida albicans* ATCC 25923.

Óleos essenciais	Concentração (%)	
	CIM	CFM
Copaíba	3,3 <sup>c1</sup>	6,25 <sup>bc</sup>
Cravo da Índia	12,5 <sup>b</sup>	12,5 <sup>b</sup>
Eucalipto	1,8 <sup>c</sup>	3,3 <sup>c</sup>
Limão	50 <sup>a</sup>	50 <sup>a</sup>
Orégano	50 <sup>a</sup>	50 <sup>a</sup>
Valor p	0,011	0,011

<sup>1</sup>Letras diferentes na mesma fileira indicam diferenças significativas a  $p < 0,05$ .

Os resultados da Tabela 2 indicam diferenças significativas, nos percentuais de redução da carga microbiana para cada um dos intervalos avaliados, sendo que para os primeiros 15 minutos de exposição, o eucalipto foi mais eficiente na redução da contagem de *Candida albicans*, enquanto que o óleo de copaíba se mostrou a menos eficaz nos primeiros 15 minutos.

Para os quinze minutos subsequentes, o orégano apresentou-se mais eficaz, reduzindo 88,9% da contagem microbiana em relação ao intervalo anterior. Os óleos de copaíba, cravo da Índia e eucalipto reduziram totalmente a população de *C. albicans* no intervalo entre 75-90 minutos, já os de orégano e limão entre 90-105 e 105-120, respectivamente.

Tabela 2 – Medianas dos percentuais de redução da contagem microbiana de *Candida albicans* ATCC 25923 frente a diferentes óleos essenciais de plantas medicinais.

Tempo (min)	% de redução de <i>Candida albicans</i>					Valor p <sup>1</sup>
	Cop	Crav.	Euca	Limão	Oréga	
0-15	43,3 <sup>b2</sup>	82,2 <sup>ab</sup>	89,2 <sup>a</sup>	86,0 <sup>ab</sup>	83,0 <sup>ab</sup>	0,039
15-30	82,5 <sup>ab</sup>	80,6 <sup>ab</sup>	79,8 <sup>b</sup>	81,7 <sup>ab</sup>	88,9 <sup>a</sup>	0,011
30-45	75,6 <sup>b</sup>	85,2 <sup>a</sup>	83,0 <sup>ab</sup>	79,1 <sup>ab</sup>	76,9 <sup>ab</sup>	0,009
45-60	79,8 <sup>ab</sup>	73,1 <sup>ab</sup>	82,7 <sup>a</sup>	33,2 <sup>b</sup>	48,9 <sup>ab</sup>	0,011
60-75	86,4 <sup>a</sup>	79,8 <sup>ab</sup>	65,0 <sup>ab</sup>	57,6 <sup>b</sup>	72,6 <sup>ab</sup>	0,008
75-90	100	100	100	92,6	96,1	-
90-105	-	-	-	99,2	100	-
105-120	-	-	-	100	-	-

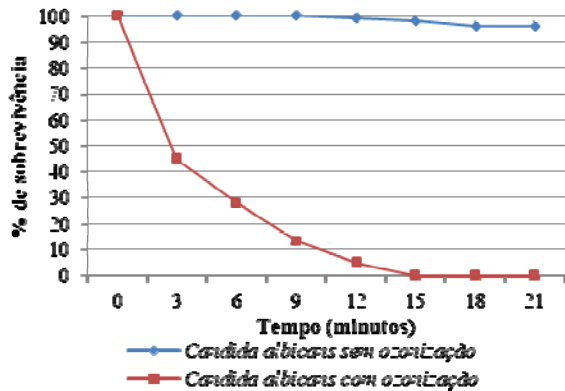
<sup>1</sup>Valor p referente ao teste de Kruskal-Wallis.

<sup>2</sup>Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas a  $p < 0,05$ .

Cop= copaíba, Crav= Cravo da Índia, Euca=eucalipto, Oréga= orégano.

Os resultados apresentados na figura 1 evidenciam o efeito fungicida do ozônio sobre *C. albicans*. Nos 3 primeiros minutos de exposição ao ozônio houve redução de 45% da carga microbiana inicial, nos doze minutos subsequentes a redução foi gradual, sendo necessários 15 minutos para redução de 100%.

Figura 1: Efeito da ozonização sobre *Candida albicans* ATCC25923.



## Discussão

O ozônio é um oxidante e desinfetante potente, sendo capaz de inativar as bactérias, bolores e leveduras, esporos, protozoários e vírus. No presente trabalho a água ozonizada (2ppm) foi eficaz na eliminação de *C. albicans* em 15 minutos de tratamento (Figura 1).

Os óleos essenciais, produtos do metabolismo secundário de plantas, apresentam atividade antimicrobiana. A atividade antibacteriana vai depender do tipo, composição e concentração da espécie ou do óleo essencial, a composição do substrato, o processamento e condições de estocagem e tipo do micro-organismo em questão [11]. Os óleos de copaíba, eucalipto e cravo da Índia apresentaram maior eficácia que os de limão e orégano (Tabelas 1 e 2).

## Conclusão

A água ozonizada (2ppm) e os óleos essenciais foram eficazes no controle *in vitro* de *Candida albicans* ATCC25913.

## Referências

- [1] Forche A, May G, Beckerman J, *et al.* A system for studying genetic changes in *Candida albicans* during infection. *Fungal of Genetic and Biology*. 2003, 39(1): 38-50.
- [2] Tozzo AB, Grazziotin NA. Candidíase vulvovaginal. *Perspectiva, Erechimical*. 2012, 36(133): 53-62.
- [3] Barbedo LS, Sgarbi DBG. Candidíase. *jornal brasileiro de doenças sexualmente transmissíveis*. 2010, 22(1): 22-38.
- [4] Tiraschi IN, Carnovale S, Benetucci A, *et al.* Brote de candidemia por *Candida albicans* em neonatologia.

*Revista Iberoamericana de Micologia*. 2007, 24: 263-267.

[5] Matta DA, De Almeida LP, Machado A M, *et al.* Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995–2003. *Diagnostic Microbiology and Infectious*. 2007, 57( 4): 399–404.

[6] Siqui AC, Sampaio, ALF, Sousa MC, Henriques MGMO, Ramos, MFS. Óleos essenciais - potencial antiinflamatório. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*. 2000, 16: 38-43.

[7] Guerrer LV, CunhaKC, Nogueira MCL *et al.* In vitro antifungal activity of ozonized sunflower oil on yeasts from onychomycosis. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2012, 43(4): 1315-1318.

[8] Silva, RA, Garotti, JER, Silva, RSB *et al.* Analysis of the bactericidal effect of ozone pneumoperitoneum. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2009, 24 (2): 124-127.

[9] Abelan US, Zangaro RA, Kozusny-Andreani DI. Avaliação da atividade antimicrobiana da água ozonizada em alicates utilizados por manicures. In: Encontro de Pós Graduação e Iniciação Científica. ISSN: 2317/7586, 2003, UNICASTELO- Fernandópolis-SP, Anais do Encontro de Pós Graduação e Iniciação Científica, UNICASTELO- Fernandópolis-SP, v.1. p 177.

[10] NCCLS - National Committee For Clinical Laboratory Standards. Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacterial that grow aerobically: Approved Standard M7.A6. 7.ed. Pennsylvania: Wayne, 2004.

[11] Bertini LM. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. *Revista Infarma*. 2005, 17(314):80-83.