



Atividade antifúngica *in vitro* do timol e carvacrol sobre espécies de cândida

In vitro antifungal activity of timol and carvacrol on candida species

Actividad antifúngica in vitro del timol y carvacrol sobre especies de cándida

Luciana Thaís Rangel Souza¹, Mateus Cardoso Oliveira¹, Cecília Correia Costa¹, Isabel Celeste Caires Pereira Gusmão¹

1. Department of Dentistry, Faculdade Independente do Nordeste, FAINOR, Vitória da Conquista, BA, Brazil.

ABSTRACT

Aim: to evaluate the *in vitro* action of thymol and carvacrol against the yeasts of *Candida albicans* ATCC10231 and *Candida krusei* ATCC34135. **Method:** A laboratory study was performed to evaluate antifungal activity. The characterization of the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of the thymol essential oil was carried out using the technique where the microdilution is performed, in which a plate containing 96 wells is used. The determination of the Minimum Fungicidal Concentration (MFC) was performed by dripping 10 µL of each of the concentrations evaluated on Sabouraud agar plates. **Results:** The MIC of thymol and carvacrol for *C. albicans* was 40 µg/mL and for *Candida krusei* it did not present antifungal activity. While the MIC of nystatin was 0.03mg for both species with thymol and carvacrol. **Conclusion:** Thymol presented satisfactory antifungal activity against the pathogens studied, but carvacrol did not present antifungal activity.

Keywords: Phytotherapy; Lippia; Thymol.

RESUMÉN

Objetivo: evaluar la acción *in vitro* del timol y carvacrol frente a las levaduras de *Candida albicans* ATCC10231 y *Candida krusei* ATCC34135. **Método:** Se realizó un estudio de laboratorio para evaluar la actividad antifúngica. La caracterización de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del aceite esencial del timol fue efectuada a través de la técnica donde se realiza la microdilución, en ésta se utiliza una placa que contiene 96 cavidades. La determinación de la Concentración Fungicida Mínima (CFM) fue realizada a través de goteo de 10 µl de cada una de las concentraciones evaluadas en placas de agar Sabouraud. **Resultados:** La CIM del timol y carvacrol para *C. albicans* fue de 40 µg/mL y para *Candida krusei* no presentó actividad antifúngica. Mientras que la CIM de la nistatina fue de 0.03mg para ambas especies con timol y carvacrol. **Conclusión:** El timol presentó una actividad antifúngica satisfactoria frente a los patógenos estudiados, pero el carvacrol no presentó actividad antifúngica.

Palabras-clave: Fitoterapia; Lippia; Timol.

RESUMO

Objetivo: avaliar a ação *in vitro* do timol e carvacrol frente as leveduras de *Candida albicans* ATCC10231 e *Candida krusei* ATCC34135. **Método:** Realizou-se um estudo laboratorial, para avaliação de atividade antifúngica. A caracterização da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial do timol foi efetuada através da técnica onde se realiza a microdiluição, nesta é utilizada uma placa que contém 96 cavidades. A determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi realizada através de gotejamento de 10 µL de cada uma das concentrações avaliadas em placas de agar Sabouraud. **Resultados:** A CIM do timol e carvacrol para *C. albicans* foi de 40µg/ mL e para *Candida krusei* não apresentou atividade antifúngica. Enquanto que a CIM da nistatina foi de 0.03mg para ambas espécies com timol e carvacrol. **Conclusão:** O timol apresentou uma atividade antifúngica satisfatória frente aos patógenos estudados, porém o carvacrol não apresentou atividade antifúngica.

Palavras-chave: Fitoterapia; Lippia; Timol.

Como citar este artigo:

Souza LTR, Oliveira MT, Costa CC, Gusmão ICCP. *In vitro* antifungal activity of timol and carvacrol on candida species. Rev Pre Infec e Saúde [Internet]. 2018;4:7673. Available from: <http://www.ojs.ufpi.br/index.php/nupcis/article/view/7673> DOI: <https://doi.org/10.26694/repis.v4i0.7673>

INTRODUÇÃO

A cavidade oral corresponde a um grande reservatório de microrganismos, sendo dessa forma profundamente relevante para a saúde e a doença do hospedeiro. Podem ser destacados como os principais microrganismos que comprometem a saúde oral, o *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus*, *Candida albicans*, *Candida krusei* dentre outros¹. Diante dessas evidências, é cada vez mais notório o aumento na incidência de infecções fúngicas, tendo como destaque a *Candida albicans* e a *Candida krusei*.

A *Candida* é considerada um micro-organismo oportunista que está presente na microbiota do ser humano, assim como em outros sítios do corpo. É um fungo com muitos tipos de virulência, sendo alguns deles a capacidade de se aderir à alguns tecidos como, por exemplo a superfície dentária, a presença de enzimas hidrolíticas e a morfogênese². Diante desses fatores favoráveis, quando ocorre algum desequilíbrio biológico, favorecendo um crescimento fúngico maior que 10⁶ unidades formadoras de colônias, essas espécies de fungos podem evoluir numa zona favorável para uma candidíase ou estomatite por dentadura, por exemplo. Entretanto, é importante salientar que esses micro-organismos não costumam promover processos infecciosos em indivíduos sem comprometimento sistêmico elevado^{1,2}.

Como em qualquer outra área com favorecimento de crescimento microbiano, a superfície dentária também consiste num local 'ideal' para a instalação de diversas espécies de microrganismos. O acúmulo de microrganismo na superfície do dente é denominado biofilme dental. Nesse sentido, pode ocorrer um

crescimento desordenado de fungos e/ou bactérias diante de fatores específicos, fatores esses como resistência a medicamentos antifúngicos e formação refratária de biofilme após longos períodos de exposição à terapia antibiótica, promovendo dessa forma, algumas patologias, como a candidíase oral^{3,4}.

No tratamento dessas doenças orais, o principal intuito é neutralizar o pH local devido ao fato do metabolismo do microrganismo deixar o meio relativamente ácido. Normalmente, utiliza-se antifúngicos convencionais, como a nistatina. Entretanto, existem linhas de pesquisa que demonstram o quão eficaz são algumas fórmulas preparadas através da extração de substâncias em plantas nativas brasileiras⁵.

Têm-se então o timol e o carvacrol, substâncias obtidas por meio da planta *Lippia sidoides*, popularmente conhecida como alecrim pimenta. Eles são considerados compostos fenólicos presentes em alguns óleos essenciais como o de orégano. Assim existe um crescente interesse na utilização dessas substâncias, devido as suas propriedades antioxidante e antimicrobiana⁵.

Partindo do pressuposto de que na odontologia deve-se usar de artifícios para manter a cavidade oral o mais livre possível de microrganismos patógenos, o uso tópico de timol e carvacrol em pacientes com risco alto de desenvolvimento de patologias relacionadas ao acúmulo de fungo, pode ser instalado evitando possíveis danos.

Diante do exposto objetivou-se avaliar a atividade antifúngica dos fitoconstituintes Timol e Carvacrol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados

Unidos) frente a *Cândida albicans* e *Cândida krusei*.

MÉTODOS

Trata-se de uma pesquisa experimental realizada no Laboratório de Microbiologia da FAINOR-Faculdade Independente do Nordeste do estado da Bahia.

Para realização do experimento utilizou-se cepas de *Cândida albicans* ATCC 10231 e *Cândida krusei* ATCC 34135 cedidas pelo Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro. Para reativação das leveduras foram retiradas aliquotas de 5mL de cada levedura em estoque e acrescentadas 5mL de caldo Sabouraud (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) incubou-se a 37°C a 48hs. Após isso foi feito o ajuste para escala de MacFarland 0,5% com solução salina a 0,85% de NaCl.

O resultado foi uma suspensão que foi inserida no agitador vórtex durante 15 segundos tendo a densidade celular ajustada, com espectrofotômetro com objetivo de obtenção de transmitância semelhante a uma solução-padrão da escala 0,5 de McFarland com comprimento de onda de 530nm. Essa etapa gerou uma suspensão-padrão de fungo com aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL unidades formadoras de colônias (UFC) por mL.

A técnica de microdiluição com a utilização das 96 cavidades de base em formato de "U" em triplicata, foi a escolhida para se determinar a CIMA⁶. Em cada cavidade da placa foi adicionado 100 µL do meio líquido Caldo Sabouraud, 20 µg/mL do inóculo da suspensão fúngica em salina. A placa foi preenchida

respeitando a ordem numérica e em seguida foram adicionadas concentrações do timol e carvacrol variando de 15 µg / mL a 400 µg / mL, As concentrações foram diluídas anteriormente, iniciando pelo primeiro poço de cada coluna da placa, neste momento foi realizada a microdiluição seriada. A última cavidade foi separada para realização do controle de crescimento dos micro-organismos. Este material foi levado à estufa por 48 h a 37°C.

Após o tempo de incubação adequado, foram adicionados 35µg/mL de resazurina (0.01%, 10mg diluída em 80mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) um indicador colorimétrico de oxidação-redução. Procedeu-se visualmente pela ausência ou presença do micro-organismo. As placas foram seladas com filme plástico e reincubadas por mais 1 hora para posterior leitura. Portanto, o último poço azul (da esquerda para a direita) era aquele com a MIC. Após 48h de incubação a 37°C, a concentração com menos Timol e Carvacrol capaz de impedir o crescimento visível da subcultura foi considerado como o CFM (Concentração Fungicida Mínima).

Por conseguinte, foi estabelecida como CIM a menor concentração do Timol e Carvacrol capaz de inibir o crescimento do microrganismo ensaiado. Visualmente esta definição foi alcançada por uma mudança da coloração do corante indicador.

A determinação da CFM foi realizada pelo gotejamento de 10µL de cada uma das concentrações avaliadas em placas de agar Sabouraud. A leitura se fez após incubação das placas a 37°C por 48h. Foi considerada CFM a concentração que não se observou crescimento

de micro-organismo do subcultivo. Os testes foram produzidos em triplicata.

RESULTADOS

A Tabela 1 mostra os resultados da inibição do crescimento referentes aos testes utilizando os extratos de timol e carvacrol e a nistatina como antimicrobianos. Observa-se que as preparações apresentaram capacidade antifúngica para *Candida albicans*. Enquanto que para *Candida krusei*, o carvacrol não apresentou

atividade antifúngica in vitro do timol e carvacrol atividade antimicrobiana. Não houve contaminação do caldo ou extratos testados no controle negativo. A nistatina inibiu as leveduras em 0.03 µg/mL (Tabela1).

A observação dos resultados nesse estudo possibilitou verificar que os extratos timol apresentaram efeito fungistático e fungicida sobre a cepa de *C.albicans*, enquanto que para *C.krusei* não apresentou atividade antimicrobiana. A avaliação da (CFM) confirmou que a concentração de 40 µg/mL não obteve crescimento microbiano.

Tabela 1: CIM dos extratos timol e carvacrol sobre cepas padrão padronizadas de *Candida albicans* e *Cândida krusei*

Cepa (µg / mL)	CIM (Timol) (µg / mL)	CIM(Carvacrol) (µg / mL)	Nistatina (µg / mL)
<i>Candida albicans</i>	40	40	0.03
<i>Candida krusei</i>	-	-	0.03

- Sem atividade antimicrobiana

DISCUSSÃO

O atual aumento de resistência aos antimicrobianos, incentiva a pesquisa por novos agentes capazes de impedir o crescimento de microorganismos, sendo uma importante estratégia nos tratamentos alternativos contra infecções fúngicas. Diante disso, vários estudiosos têm aumentado o interesse na pesquisa de extratos fornecidos por plantas como potencial antimicrobiano^{7,8}. Essas

pesquisas têm aumentado frente a microrganismos presentes na cavidade oral.

A *Candida albicans* está presente em aproximadamente de 30 a 50% da cavidade oral das pessoas, sendo a espécie mais virulenta, capaz de produzir fosfolipases e proteases que destoem o tecido do hospedeiro. A *Candida krusei* também é um importante patógeno que contribui para a doença, a espécie é mais resistente a agentes terapêuticos aumentando o número de pessoas imunocomprometidas e com isso, a frequência de agentes antifúngicos⁹.

A terapia antifúngica para infecções por *Candida* é desafiadora, visto que o tratamento é dificultado devido à característica eucariótica das células desses micro-organismos, que são semelhantes às células hospedeiras. Além disso, há poucos antifúngicos disponíveis para tratar infecções causadas por esses fungos¹⁰. Atualmente são utilizadas em grande escala a classe de antifúngicos azólicos que é, infelizmente, fungistáticos ao invés de fungicida, e seu uso prolongado contribui para o desenvolvimento de cepas resistentes¹¹.

O presente estudo mostrou uma possibilidade terapêutica com o timol para frente a candidíase desenvolvida por *C.albicans* que é a maior prevalente na microbiota bucal. Uma perspectiva interessante seria a adição do extrato timol em colutórios bucais potencializando seus efeitos antimicrobianos para candidíase.

Nesse sentido, este estudo investigou através de testes *in vitro*, atividade do timol e carvacrol contra cepas de *C.albicans* e *C.krusei*. Diante disto, constatou-se que o timol e carvacrol apresentam excelente poder antifúngico, com MIC e CFM de 40 µg / mL e CIM da nistatina de 0.03µg / mL para ambas as cepas, enquanto que os mesmos fitoconstituintes não apresentaram atividade antifúngica para *C.krusei* e a nistatina apresentou 0.03 µg / mL (Tabela1).

Lima et al. (2013)¹, em seu estudo semelhante a este, obtiveram um valor entre 256 e 512 µL/mL do carvacrol na a *Candida albicans*. Em outra pesquisa realizada por Manohar et al. (2001)², a MFC do carvacrol para *C.albicans* ATCC- 48274 foi de 500 µL/mL. As

concentrações da MIC e MFC foram baixas apresentando um efeito fungicida.

Entende-se, dessa forma, que os resultados desta pesquisa corroboram com estudos realizados anteriormente pela literatura, que mostra que os compostos de origem vegetal para possuir forte/boa atividade antifúngica, precisam que suas CIMs estejam pelo menos compreendidas entre 50-500µg/mL¹².

Os fitoconstituintes de carvacrol e timol inibem o crescimento celular alterando o funcionamento da parede e membrana celular, conforme afirmam Lee et al. (1999)⁴, diminuindo a permeabilidade. Estudos demonstram que óleo essencial que apresenta o timol e carvacrol como componentes apresentam atividade antimicrobiana. Assim, Pozzart et al. (2010)⁵ demonstrou um efeito antimicrobiano com o óleo essencial de orégano que contem 58% de carvacrol e uma MIC menor que 800 µL/mL contra *Cândida*.

Assim, o caminho é otimizar o uso do carvacrol e timol em associação com drogas convencionais. As associações têm sido amplamente estudadas em métodos *in vitro* o “checkerboard” é uma técnica amplamente utilizada^{13,14}.

Assim, em vista dos resultados os fitoconstituintes carvacrol e timol pode eventualmente serem utilizados em associação com drogas convencionais contra candidíase. Entretanto, são necessários maiores pesquisas para esclarecer o mecanismo de toxicidade dos extratos.

Esse estudo apresenta limitações. Foi evidenciada a dificuldade logística e a escassez de certos materiais que ampliariam o leque da

pesquisa. Estas dificuldades impossibilitaram, por exemplo, possíveis ensaios com biofilme dentário. Essa possibilidade seria de grande significância, uma vez que a microbiota bucal forma biofilme.

CONCLUSÃO

Após apresentação dos resultados, conclui-se que os fitoconstituintes timol e carvacrol apresentaram atividade antifúngica bastante satisfatória para *Candida albicans*, que é a principal levedura presente na cavidade bucal, porém, para a *Candida krusei* não apresentou efetividade. Sugere-se que o timol analisado exerça um potencial para a produção de constituintes com atividade antifúngica contra cepas de *C.albicans*, assim, mostrando uma alternativa terapêutica para tratamentos de infecções fúngicas e na descoberta de novos fármacos.

São necessários estudos mais aprofundados para verificar toxicidade das plantas e isolar os compostos ativos responsáveis pela atividade biológica. Entretanto, pesquisas e testes farmacológicos com maior abrangência devem ser desenvolvidos, levando em consideração a fisiologia do corpo humano, bem como interferência dos fatores sistêmicos na da microbiota bucal.

REFERÊNCIAS

1. Rajarathnam S, Bano Z. Pleurotusmushrooms Part III. Biotransformations of natural lignocellulosic wastes: commercial applications

and implications. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2016; 28(1):31-113.

2. Zhang J, Wang G, Li H, Zhuang C, Mizuno T, Ito H, et al. Antitumor polysaccharides from a Chinese mushroom, “Yuhuangmo”, the fruiting body of *Pleurotuscitrinopileatus*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2014; 58(esp):1195-1201.

3. Gunde N, Cimerman A. *Pleurotus*fruiting bodies contain the inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase-Lovastatin. Experimental Mycology. 1999; 19(1):1-6.

4. Robbins WJ, Kavanagh F, Hervey A. Antibiotic substances from basidiomycetes I. *Pleurotusgriseus*. In: Robbins WJ, Kavanagh F, Hervey A. Proc Natl Acad Sci USA. 1950; 36(2):102-106.

5. Wisbeck E, Robert AP, Furlan SA. Avaliação da produção de agentes antimicrobianos por fungos do gênero *Pleurotus*. Revista Saúde e Ambiente. 2015; 3(2):7-10.

6. Hara M, Yochida M, Morimoto M, Nakano H. 6-deoxylludin M, a new antitumor antibiotic: fermentation, isolation and structural identification. The Journal Antibiotics, 2017; 10 (11):1643-46.

7. Garcia I, Cisneros F, Sadrés JM. Estudio de La actividad antimicrobiana em el cultivo de *Pleurotustreatus*. Alimentaria. 2010; (292):63-5.

8. Graciolli LA, Figueiro GG. Influência da composição química do substrato no cultivo de *Pleurotus florida*. Ciencia Agrote. 2011; 35(5):924-30.

9. Bianco MAC. Basidiomiceti in relazione all'antibiosi nota II. Attivita'antibioticadeimiceli e dei

liquidocultura. Giornale di Batteriologia Virologia ed Immunologia. 1981; 74(1):267-274.

10. Rajarathnam S, Bano Z. *Pleurotus* mushrooms. Part III. Biotransformations of natural lignocellulosic wastes: commercial applications and implications. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2016; 28(1):31-113.

11. Tonetto LMI, Brust RPG, Milnitsky L. Perspectivas metodológicas na pesquisa sobre o comportamento do consumido. Psicol. cienc. Prof. 2014; 34(1):180-195.

12. Dias ES, Koshikumo SEM, Schwan R, Silva R. Cultivo do cogumelo *pleurotussajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. Ciência e Agrotecnologia. 2016; 27(6):1363-1369.

13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Eight Edition. Cad.Cult.Ciênc. 2016.

14. Kasetrathat C, Ngamrojanavanich N, Wiyakrutta S, Mahidol C, Ruchirawat S, Kittakoop P. Cytotoxic and antiplasmodial substances from marine-derived fungi. Phytochemistry. 2017; 69(ESP):2621-26.

15. Beltran MJG, Estarron M, Ogura T. Volatile compounds secreted by Oyster mushrooms

(*Pleurotustreatatus*) and their antibacterial activities. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2017; 45(1):4049-52

16. Barbosa V, Scheiffer GFC, Cardozo AGL, Pietruchinski E, Santoa CZ, Silveira D, et al. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. e tintura de própolis frente à bactéria causadora da acne *Propionibacterium*. Rev. Bras. Pl. Med. 2014; 16(2):169-173.

17. Nakamura CV, Ueda NT, Bando E, Melo AFN, Cortez DAG, Dias FBP. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94(10):675-78.

18. Pessini GL, Holetz FB, Sanches NR, Cortez DAG, Dias FIBP, Nakamura CV. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. Rev. Bras. Farmacogn. 2013; 13(1):21-24.

19. Bresolin TMB, Cechinel VF. Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí: UNIVALI; 2013.

Submetido: 2018-10-21

Aceito: 2018-11-26

Publicado em: 2018-12-30

COLABORAÇÕES

LTRS fez contribuições substanciais na concepção ou desenho do trabalho; na coleta, análise e interpretação dos dados e na redação do artigo ou na sua revisão crítica; COM fez contribuição na coleta, análise e interpretação dos dados e na redação do artigo ou na sua revisão crítica; CCC contribuiu na coleta, análise e interpretação dos dados e na redação do artigo ou na sua revisão crítica e versão final à ser publicada e ICCPG, contribuições substanciais na concepção ou desenho do trabalho e versão final à ser publicada.

CONFLITOS DE INTERESSE

Rev Pre Infec e Saúde.2018;4:7673

Não há conflitos de interesse a declarar

CORRESPONDENCIA

Luciana Thaís Rangel Souza

Endereço: Av. Luís Eduardo Magalhães, 1305 - Candeias. Vitória da Conquista - BA.

Telefone: (77) 3161-1000

E-mail: luthaisrs@gmail.com