

Atividade antifúngica in vitro de extratos aquosos do bagaço da Oliveira (*Olea europaea* L.) frente a isolados fúngicos causadores de candidíase, dermatofitose e esporotricose em humanos e animais

In vitro antifungal activity of aqueous extracts of olive bagasse (*Olea europaea* L.) against fungal that cause candidiasis, dermatophytosis and sporotrichosis in humans and animals

Actividad antifúngica in vitro de extractos acuosos de bagazo de olivo (*Olea europaea* L.) frente a hongos causantes de candidiasis, dermatofitosis y esporotricosis en humanos y animales

Recebido: 11/04/2022 | Revisado: 19/04/2022 | Aceito: 22/04/2022 | Publicado: 27/04/2022

Márcia Kutscher Ripoll

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8681-6267>
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil
E-mail: marciaripoll@hotmail.com

Otávia de Almeida Martins

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0057-3549>
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
E-mail: otavia.martins@hotmail.com

Stefanie Bressan Waller

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6719-1794>
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
E-mail: waller.stefanie@yahoo.com.br

Anna Luiza Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9196-2501>
BoaFé®, Brasil
E-mail: annavet@live.com

Renata Osório de Faria

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7266-2319>
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
E-mail: renataosoriovet@gmail.com

Angelita dos Reis Gomes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5325-044X>
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
E-mail: angelitagomes@gmail.com

Tony Picoli

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4806-4973>
Faculdade de Americana, Brasil
Universidade São Francisco, Brasil
E-mail: tony_picoli@yahoo.com.br

Mário Carlos Araújo Meireles

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0654-6181>
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
E-mail: meireles@ufpel.tche.br

Tanize dos Santos Acunha

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7048-4942>
Universidade de Ribeirão Preto, Brasil
E-mail: tanize.dos-santos-acunha@rothamsted.ac.uk

Fabio Clasen Chaves

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5773-0800>
Scotts Miracle-Gro, EUA
E-mail: fabio.chaves@ufpel.edu.br

João Roberto Braga de Mello

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7120-7709>
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil
E-mail: jmello@gabinete.ufrgs.br

Resumo

As infecções fúngicas tem se tornado cada vez mais frequentes nos últimos anos. Destacam-se as dermatofitoses, esporotricoses e candidoses. Em função da resistência aos fármacos disponíveis e tendo em vista diversificar o âmbito farmacêutico, realizou-se o estudo a partir do bagaço de *O. europaea*. Estudos relacionados à oliveira não abordam o

bagaco que representa potencial alternativa econômica devido a suas toneladas descartadas pela indústria. Objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil sensibilidade *in vitro* de isolados fúngicos frente extratos aquosos de bagaco de *O. europaea*. Testar toxicidade celular dos extratos utilizados e determinar presença e quantidade dos compostos fenólicos (oleuropeína e hidroxitirosol). Não foi observado atividade antifúngica desses extratos aquosos diante dos isolados de dermatófitos e *Sporothrix brasiliensis*. Dos isolados de *Candida* spp. testados para susceptibilidade, dois foram sensíveis ao extrato de decoção do bagaco a partir da concentração 50 mg/ml de DEC 10'. Na toxicidade da decoção do bagaco de oliveira, observou-se concentrações a partir de 12,5 mg/ml permitiram que pelo menos 50% das células MDBK se mantivessem viáveis. As concentrações de 3,13 até 0,78 mg/ml foram seguras, pois ocorreu 100% de viabilidade celular. Dos compostos (CLAE) hidroxitirosol variou a concentração de 8×10^{-4} a 34×10^{-4} mg/ml em INF 10' e de 11×10^{-4} a 81×10^{-4} mg/ml em DEC 10'. Para oleuropeína, os extratos DEC 10' variaram sua concentração de 87×10^{-3} a 7×10^{-3} mg/ml, já para INF 10' os valores foram de 23×10^{-3} mg/ml a não detectado em algumas variedades.

Palavras-chave: Extrato; Sucetibilidade in vitro; Oleuropeína; Hidroxitirosol; Citotoxicidade.

Abstract

Fungal infections have become frequently in recent years. Dermatophytosis, sporotrichosis and candidiasis stand out. Due to the resistance to available drugs and with a view to diversifying the pharmaceutical field, the study was carried out using the bagasse of *O. europaea*. Studies related to olive trees do not address bagasse, which represents a potential economic alternative to its discarded tons by the industry. The objective of this work was to evaluate the *in vitro* sensitivity profile of fungal isolates against aqueous extracts of *O. europaea* bagasse. To test the cellular toxicity of the extracts and to determine the presence and amount of the main phenolic compounds. No antifungal activity of these aqueous extracts was observed against the isolates of dermatophytes and *Sporothrix brasiliensis*. The *Candida* spp. tested for *in vitro* susceptibility, two were sensitive to bagasse decoction extract from a concentration of 50mg/ml of DEC 10'. In the toxicity of the olive pomace decoction, concentrations from 12.5 mg/ml allowed at least 50% of the MDBK cells to remain viable. Concentrations from 3.13 to 0.78 mg/ml were safe, as 100% cell viability occurred. Of the hydroxytyrosol (HPLC) compounds, the concentration varied from 8×10^{-4} to 34×10^{-4} mg/ml in INF 10' and from 11×10^{-4} to 81×10^{-4} mg/ml in DEC 10'. For oleuropein, the DEC 10' extracts varied their concentration from 87×10^{-3} to 7×10^{-3} mg/ml, while for INF 10' the values were from 23×10^{-3} mg/ml to not detected in some varieties.

Keywords: Aqueous extract; Oleuropein; Hydroxytyrosol; Cytotoxicity.

Resumen

Las infecciones fúngicas se han vuelto cada vez más frecuentes en los últimos años. Destacan las dermatofitosis, esporotricosis y candidiasis. Debido a la resistencia a los fármacos disponibles y con el fin de diversificar el campo farmacéutico, el estudio se realizó utilizando bagazo de *O. europaea*. Los estudios relacionados con el olivo no abordan el bagazo, que representa una potencial alternativa económica por sus toneladas descartadas por la industria. El objetivo de este trabajo fue evaluar el perfil de sensibilidad *in vitro* de aislados fúngicos frente a extractos acuosos de bagazo de *O. Europeae*. Testar la toxicidad celular de los extractos utilizados y determinar la presencia y cantidad de los principales compuestos fenólicos. No se observó actividad antifúngica de estos extractos acuosos frente a los aislados de dermatofitos y *Sporothrix brasiliensis*. De la *Candida* spp. probados para susceptibilidad *in vitro*, dos fueron sensibles al extracto de decocción de bagazo a partir de una concentración de 50 mg/ml de DEC 10'. En la toxicidad de la decocción de orujo de oliva, concentraciones a partir de 12,5 mg/ml permitieron que al menos el 50% de las células MDBK permanecieran viables. Las concentraciones de 3,13 a 0,78 mg/ml fueron seguras, ya que se produjo una viabilidad celular del 100%. De los compuestos de hidroxitirosol (HPLC), la concentración varió de 8×10^{-4} a 34×10^{-4} mg/ml en INF 10' y de 11×10^{-4} a 81×10^{-4} mg/ml en DEC 10'. Para la oleuropeína, los extractos de DEC 10' variaron su concentración de 87×10^{-3} a 7×10^{-3} mg/ml, mientras que para INF 10' los valores fueron de 23×10^{-3} mg/ml hasta no detectarse en algunas variedades.

Palabras clave: Extracto acuoso; Oleuropeína; Hidroxitirosol; Citotoxicidad.

1. Introdução

As infecções fúngicas tem se tornado cada vez mais frequentes nos últimos anos, tanto na medicina humana como veterinária, principalmente devido a imunossupressão causada por doenças e medicamentos com quadros agravados em função da resistência aos fármacos disponíveis. (Stopiglia et al., 2013; Vieira & Santos 2017; Coelho et al., 2020). Entre estas, em medicina veterinária, destacam-se as dermatofitoses, esporotricoses e candidoses.

A dermatofitose caracteriza-se por uma doença oportunista causada por um grupo de fungos pertencentes aos gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* (Meireles & Nascente, 2009). Na clínica de pequenos animais, as principais espécies responsáveis por esta infecção são *M. canis* e *M. gypseum* (Reis-Gomes, 2012). O tratamento das dermatofitoses

normalmente é demorado, sendo muitas vezes necessário combinações de fármacos com diversos mecanismos de ação até obter-se a cura total (Gupta & Cooper, 2008), considerando relatos de casos de resistência aos fármacos de eleição para tratamento (Mukherjee et al., 2003). A esporotricose é considerada uma zoonose endêmica no Brasil e de alta prevalência em felinos e humanos, caracterizando assim, um problema de saúde pública no país (Poester et al., 2018). Resistência aos fármacos de eleição, observado em medicina veterinária, resulta em falhas terapêuticas, dificultando o processo de recuperação levando a um alto número de casos refratários, que acabam levando esses animais a óbito (Stopiglia et al., 2013; Rodrigues et al., 2014; Waller et al., 2017).

Os fungos do gênero *Candida* sp. contemplam centenas de espécies, sendo a *Candida albicans* a de maior importância devido a frequente ocorrência tanto em humanos quanto animais. É um agente de caráter oportunista e está presente como comensal nas mucosas de cerca de 50% da população de indivíduos saudáveis. Normalmente a causa da doença está associada a uma desarmonia entre os organismos presentes nas mucosas comumente causado por uso de antibióticos por longos períodos, imunodeficiência do hospedeiro, uso exacerbado de corticoterapia ou imunocomprometimento em decorrência de doenças de caráter crônico. O número de antifúngicos disponíveis no mercado ainda é irrisório quando comparado com a quantidade de antibacterianos, e além da pouca disponibilidade dos fármacos temos os mecanismos de defesa fúngica que manifestam-se de diferentes formas, como desvios metabólicos, superexpressão ou alteração de alvos farmacológicos ou diminuição da concentração do fármaco (Lacaz & Del Negro, 1994; Cowen et al., 2015; Crawford & Wilson, 2015). Tendo em vista sanar os problemas de resistência aos fármacos, altos custos dos medicamentos e redução de efeitos colaterais, o conhecimento de plantas medicinais como fontes terapêuticas para tratamentos de micoses apresenta-se uma alternativa farmacológica, onde estudos que usam parte de plantas já foram realizados, comprovando a eficácia da utilização de fitoterápicos como fungicidas e/ou fungistáticos (Odds et al., 2003; Korukluoglu et al., 2006; Johann et al., 2007; Waller et al., 2016).

A *Olea europaea* L., pertencente à família das Oleaceae, é a única espécie dentre a família, a produzir fruto comestível, a azeitona, a qual utiliza-se para realização da extração do azeite. É considerado um dos cultivos mais antigos e no Brasil sua produção tem destaque nas regiões Sul e Sudeste (Coutinho, 2015). Na indústria oleícola, durante cultivo e processamento do azeite há grande produção de resíduos. Esses resíduos podem ser provenientes da poda, onde ocorre o descarte das folhas e também do processamento do azeite, podendo ser classificados em resíduos líquidos e sólidos (bagaço). Estudos realizados em regiões de grandes produções localizadas na Europa indicam que cerca de 20% do total da demanda de azeitonas é convertido em azeite, ou seja, em uma produção de 100 kg de azeitona, apenas 20 kg são convertidos em azeite, 80 kg são destinados ao descarte (Alcaide et al., 2010). Esses subprodutos têm sido utilizados de diversas formas, sendo eles, adubos e pesticidas (Cabrera, et., 2010), ração animal, obtenção de energia (More, 2008) e também através dos seus extratos, revelaram atividade antimicrobiana (Pereira et al., 2007; Markin et al., 2003; Martiny et al., 2016; Böhmer, 2018).

Com aproximadamente 98% da composição do azeite estão os ácidos graxos (Luchetti, 2002), dentre eles o ácido oleico, importante auxiliar na redução de doenças que acometem a artéria coronária (Boateng et al., 2016). Além de ácidos graxos, carotenoides e tocoferóis também estão presentes na composição (Gandul-Rojas & Minguez-Mosquera, 1996; Giuffrida et al., 2007), assim como os fenóis que podem ser divididos em fenóis simples, secoiridoides e lignanas, responsáveis por inúmeros benefícios à saúde (Waterman & Lockwood, 2007). Os compostos fenólicos, principalmente a oleuropeína e hidroxitiroso, entre outros elementos químicos são conhecidos pela sua ação antimicrobiana (Martiny et al., 2016; antitumoral (Salama et al., 2020; Ferreira et al., 2021), Böhmer, 2018), anti-inflamatória (Rondón Medina & Centy, 2022) e antioxidante (Salama et al., 2020). Alguns de seus extratos são caracterizados por obter atividade antifúngica frente a patógenos e por dar suporte às recuperações promovendo cicatrização de tecidos injuriados (Battinelli et al., 2006; El & Karakaya, 2009).

No entanto, estudos relacionados à oliveira não abordam o bagaço que representa potencial alternativa econômica devido a sua grande quantidade descartada pelas indústrias. A partir dessa perspectiva, o objetivo da realização deste trabalho

foi avaliar o perfil sensibilidade in vitro de isolados de *Sporothrix* spp., de *Microsporum* spp. e de isolados e cepas padrões de *Candida* spp. frente extratos aquosos de bagaço de *Olea europaeae* L., bem como testar a toxicidade celular dos extratos e determinar presença e quantidade dos principais compostos fenólicos.

2. Metodologia

2.1 Tipo de Pesquisa

O presente trabalho se trata de uma pesquisa experimental abordando o modo quantitativo (Pereira et al., 2018) no intuito de avaliação da suscetibilidade in vitro de isolados de *Sporothrix* spp., fungos do gênero *Candida* sp. e dermatófitos frente a extratos aquosos do bagaço de oliveira, juntamente com análise da presença de oleuropeína e hidroxitirosol, assim como toxicidade celular.

2.2 Material Vegetal e Obtenção dos Extratos Aquosos

O estudo foi realizado com 14 extratos derivados de bagaço de oliveira produzidos na Fazenda Guarda Velha, com localização geográfica (31°30'02"S; 53°30'29"O), no município de Pinheiro Machado/RS. As infusões e decocções foram preparadas a partir do bagaço em água destilada. Para infusão, foram colocados os bagaços em água destilada fervente durante 10 minutos (INF 10'); para decocção, ferveu-se o bagaço em água destilada durante 10 minutos (DEC 10'). Ambas formas de extratos foram realizadas em sete diferentes variedades de oliveiras, sendo elas: arbosana, arbequina, coratina, koroneiki, frontoio, manzanilla e picual. Todos extratos foram armazenados em frasco âmbar e refrigerados em geladeira.

2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os materiais usados para realização da análise foram o ácido fórmico Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EUA) e acetonitrila de JT Baker® (Phillipsburg, NJ, USA). A água ultrapura foi obtida utilizando o sistema de purificação MegaPurity®. As análises por LC-QTOF MS foram realizadas em um cromatógrafo líquido (UFLC, Shimadzu, Japão) acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução do tipo quadrupolo-tempo de voo (Maxis Impact®, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Bidentate C18 (100 × 2.1 mm, MicroSolv Technology Corporation, Eatontown, NJ, EUA) empregando como fase A água com 0,1% de ácido fórmico (v/v) e como fase B acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (v/v) e o seguinte programa de gradiente: 5% B (0,0 min), 0-90% B em 0.01-15 min, 90% em 15-18 min e 90-5% B em 18,01-20 min. Depois de cada injeção, a coluna foi re-equilibrada por 6 minutos utilizando a composição do solvente inicial. Para todas as análises foi injetado 10 µL de extrato previamente filtrado em membrana de nylon de 0,2µm, empregado um fluxo constante de 0,2 ml/min e a temperatura da coluna foi mantida a 40°C. O espectrômetro de massas foi operado no modo ESI negativo utilizando os seguintes parâmetros: voltagem do capilar, +4000V; pressão do gás de nebulização (N₂), 2 bar; fluxo do gás de secagem, 8 L min⁻¹, temperatura da fonte, 180°C; colisão de RF, 150 Vpp; transfer, 70 mS e armazenamento pré-pulso de 5 mS. Os espectros de massas foram adquiridos em um rango de 50 a 1200 m/z a 4 espectros/s para ambos modos de ionização. As análises MS/MS foram obtidas por fragmentação automática empregando os seguintes valores de energia de colisão: m/z 100, 15 eV; m/z 500, 35 eV; m/z 1000, 50 eV e usando N₂ como gás de colisão. A calibração externa foi realizada utilizando Formiato de sódio 10Mm como calibrante, cobrindo toda a faixa de aquisição de 50-1200 m/z. A concentração de hidroxitirosol e oleuropeína foi determinada de forma semi-quantitativa com base no sinal analítico do padrão interno (reserpina) adicionado a cada amostra (concentração final 4 µg/ml). Os íons monitorizados foram: hidroxitirosol ([M - H] - m/z 153,0546) e oleuropeína ([M - H] - m/z 539,1759).

2.4 Isolados Fúngicos

No estudo, foram utilizados isolados e cepas padrões dos principais agentes causadores de candidíase, isolados de dermatofitose e esporotricose em animais. Para *Candida* spp. (n=15), foram usados isolados clínicos de *C. albicans* (n=08), *C. glabrata* (n=03) e *C. tropicalis* (n=02), bem como as seguintes cepas-padrões: ATCC 14053 (*C. albicans*) e IOC 3691 (*C. albicans*). Para dermatófitos, foram usados *Microsporum canis* (n=06) e *M. gypseum* (n=10) isolados clínicos de caninos e felinos. Para *Sporothrix* spp., foram usados isolados clínicos de *S. brasiliensis* (n=20) de caninos e felinos. Os isolados clínicos e cepas-padrões foram cedidos pelo Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária (MicVet) da Universidade Federal de Pelotas (Pelotas/RS, Brasil).

Anteriormente a todos os testes, as culturas foram repicadas para ágar Sabouraud acrescentado de cloranfenicol e incubadas a 37°C por 48h para *Candida* spp. e *S. brasiliensis*, enquanto para os dermatófitos foi a 25°C por 7 dias. Recuperados da micoteca e mantidos a temperatura ambiente para realização dos experimentos (25°C).

2.5 Teste Antifúngico In Vitro

Para os testes antifúngicos, foram realizados os testes de microdiluição em caldo, conforme as recomendações propostas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) através do protocolo M27-A3 (CLSI, 2008a) para fungos leveduriforme e protocolo M38-A2 (CLSI, 2008b) para fungos filamentosos, adaptados para uso de fitoterápicos.

Inóculos fúngicos de *Sporothrix* spp. e dermatófitos foram preparados de colônias cultivadas a 27°C por 7 dias, excetuando os isolados/cepas de *Candida* spp., essas cultivadas a 35°C por 48h, que foram suspensos em tubos contendo solução fisiológico estéril e ajustado a partir da escala McFarland e, posteriormente, em um espectrofotômetro ultravioleta (UV) visível (Spectrum Instruments Co., Xangai, China) com transmitância ajustada para 80–82% no comprimento de onda de 530 nm foram realizadas as leituras. As suspensões foram diluídas em meio RPMI-1640 tamponado com 2% de glicose e MOPS [3-(N-morfolino ácido propanossulfônico)] a 1:50, v/v (Sigma®, Steinheim, Alemanha). Como adaptação da metodologia, os extratos foram diluídos em série em RPMI-1640 com 2% de glicose e MOPS na microplaca para obter concentrações variando de 100 a 1,56 mg/ml. A suspensão fúngica foi adicionada a todos os poços testados (100 µl), igualmente nos poços do controle positivo. Suspensões de extrato de oliveira diluídas em RPMI-1640 foram usadas como controle negativo. As microplacas foram incubadas a 27°C por 72 h para obter os resultados de concentração inibitória mínima (CIM). Para concentração fungicida mínima (MFC), alíquotas de 10 µl dos poços sem crescimento fúngico visível foram transferidas para placas contendo ágar Sabouraud (Acumedia, MI, EUA) e incubadas a 27°C por 72 h para *Sporothrix* spp. e dermatófitos, e a 35°C por 48 h para *Candida* spp., para visualizar o crescimento do fungo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.5.1 Teste de Toxicidade Celular

Utilizando-se de células MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney cells), cultivadas em RPMI-1640 acrescida de L-glutamina, sem bicarbonato de sódio (pH 7,2), suplementado de penicilina-estreptomicina e fungizona (PSF) em atmosfera controlada com 5% de CO₂, úmida e a 37°C, o efeito citotóxico foi estabelecido a partir do ensaio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico). Adição de tripsina nas células monocamada, suspensas em RPMI-1640, resultando em suspensão com cerca de 2x10⁵ células/ml. Alíquotas da suspensão celular foram transferidas para poços de microplacas de 96 poços e essas células incubadas juntamente com meio RPMI-1640 acrescido de soro fetal bovino e a 5% de CO₂ por 24 horas na temperatura de 37°C. Posteriormente, 100 µl de cada extrato com suas sucessivas diluições foi adicionado às microplacas nas concentrações de 100 a 0,78 mg/ml sendo essas testadas em triplicata durante 48 horas com atmosfera controlada de 5% de CO₂, úmida e a 37°C.

Sequencialmente, adicionou-se 50 µl da solução MTT a 2,5 mg/ml nos poços, incubados a 37°C por duas horas em atmosfera controlada. Em seguida, a solução MTT foi retirada e 50 µl de DMSO (dimetilsufóxido) acrescentado, para desfazer os cristais de formazan, e agitados suavemente por 5 minutos. O monitoramento das células foi realizado a partir de um microscópio invertido, e os resultados expressos em porcentagem de inibição de acordo com as células controle, está sendo considerada 100%.

3. Resultados e Discussão

Diversos extratos de oliveira já foram testados frente a bactérias e fungos (Markin et al., 2003; Böhmer, 2018), assim como sinergismo de compostos fenólicos da folha frente a bactérias (Pereira et al., 2007; Lee & Lee, 2010), aldeídos alifáticos frente a isolados e padrões de bactérias (Bisignano et al., 2001; Battinelli et al., 2006), nanopartículas de prata biossintetizadas a partir de extrato aquoso de oliveira frente a bactérias (Awwad et al., 2012), extratos comerciais de folhas de oliveira frente a bactérias e fungos leveduriforme (Sudjana et al., 2009). Outros autores testaram isoladamente a atividade de compostos específicos presentes em diversas partes da oliveira, testando a oleuropeína notaram atividade inibitórias frente a *Mycoplasma pneumoniae*, *M. pirum*, *M. hominis* e *M. fermentans* encontrando valores de CIM respectivamente de 0,36, 0,32, 0,02 e 0,02 µg/ml (Furneri et al., 2002). Assim sendo, os compostos presentes nos frutos de azeitona possuem ação antimicrobiana podendo esse efeito ocorrer de forma sinérgica ou isolada (Romero et al., 2007; Upadhyay, 2014), contudo, no presente estudo não foi observada atividade antifúngica desses extratos aquosos diante dos isolados de dermatófitos e de *Sporothrix* spp. Já para quinze isolados/cepas de *Candida* spp. testados *in vitro*, dois foram sensíveis ao extrato de decocção do bagaço de *Olea europaea* L. a partir da concentração de 50 mg/ml de DEC 10'. Os fungos do gênero *Candidas* que apresentaram sensibilidade pertenciam a espécie *albicans*, identificadas como *American Type Culture Collection* 14053 (ATCC) e do Instituto Oswaldo Cruz 3691 (IOC). A inibição da ATCC 14053 diante da DEC 10' ocorreu frente às sete variedades testadas, já para cepa IOC 3691 não foi eficiente nas variedades arbosana e frontoio. (Tabela 1). Frente ao extrato de INF 10' não se obteve resultado inibitório de nenhum isolado testado para as concentrações testadas.

Resultado que reforça estudo realizado por Korukluoglu et al. (2006), que indica que a forma de obtenção dos produtos testados influencia diretamente no resultado final, visto que devido a altas temperaturas para obtenção desses extratos aquosos, a fração não polar desses compostos evaporam e por fim acabam por não apresentar a atividade esperada. O mesmo autor também testou extratos de folhas de *O. europaea* extraída com outros solventes como álcool, cetona e acetato de etila que demonstraram atividade inibitória e antifúngica. E divergente do estudo supracitado, a matéria prima utilizada não foram folhas e sim o bagaço de *O. europaea*. Porém, outro ponto a ser destacado é o fator comportamento das espécies de *Candida* spp., pois o mecanismo de resposta e defesa das mesmas pode se apresentar de diferentes maneiras (Papon et al., 2013), sendo esperado resultados diversos entre as espécies frente a mesmos extratos (Cesar et al., 2021).

Tabela 1 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) da decocção do bagaço de sete variedades de oliveira (*Olea europaea*) - Arbequina, Arbosana, Coratina, Frontoio, Koroneiki, Manzanilla e Picual - frente a isolados clínicos animais com candidose, esporotricose ou dermatofitose por *Candida* sp., *Sporothrix brasiliensis* e *Microsporum* sp.

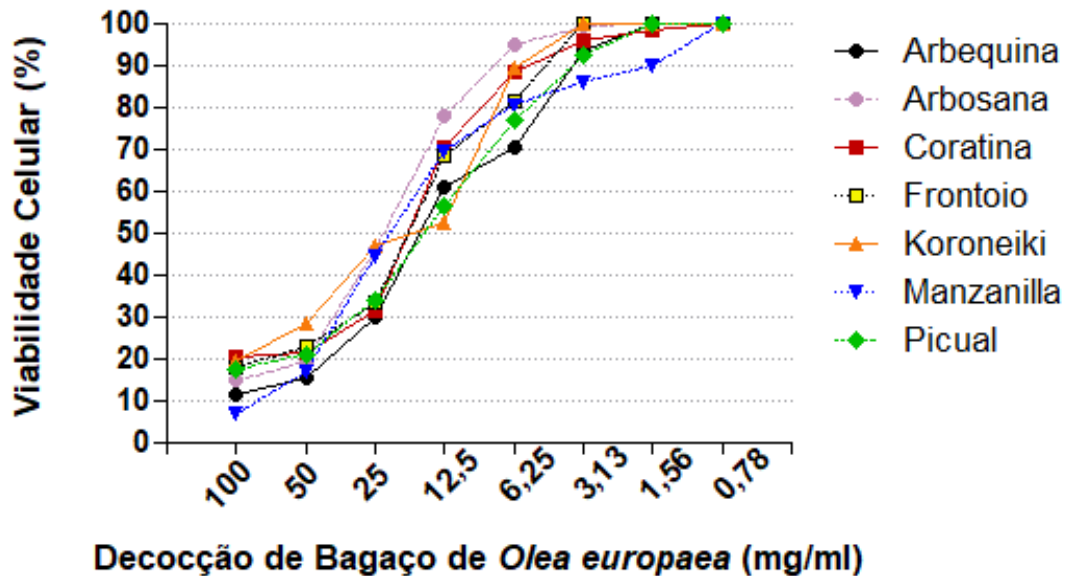
Espécie fúngica (n)	Arbequina(mg/ml)		Arbosana(mg/ml)		Coratina(mg/ml)		Frontoio(mg/ml)		Koroneiki(mg/ml)		Manzanilla(mg/ml)		Picual(mg/ml)	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>Candida</i> spp. (15)														
<i>C. albicans</i> (8)	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
ATCC 14053 (1)£	25	50	25	25	25	50	50	50	25	25	50	50	25	25
IOC 3691 (1)£	25	50	>100	>100	3,12	25	>100	>100	3,12	12,5	25	50	3,12	12,5
<i>C. glabrata</i> (3)	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>C. tropicalis</i> (2)	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Sporothrix</i> sp. (15)														
Sb (12) †	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Sb (3)*	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Microsporum</i> spp. (16)														
<i>M. canis</i> (1) †	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>M. gypseum</i> (2) †	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>M. canis</i> (5)*	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>M. gypseum</i> (8)*	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
TOTAL	25 - >100	50 ->100	25 ->100	25 - >100	3,12 - >100	25 ->100	50 - >100	50 ->100	3,12 - >100	12,5 - >100	25 - >100	50 - >100	3,12- >100	12,5 - >100

*Isolado clínico de felinos; † Isolado clínico de canino; Sb – *Sporothrix brasiliensis*; £ - *C. albicans*. Fonte: Autores.

Com relação à toxicidade da decocção (Figura 1) do bagaço de oliveira, observou-se que as concentrações a partir de 12,5 mg/ml permitiram que pelo menos 50% das células MDBK se mantivessem viáveis. Conforme a concentração de DEC10' se reduzia até 0,78 mg/ml, a viabilidade celular em MDBK aumentavam proporcionalmente. As concentrações de 3,13 até 0,78 mg/ml foram seguras, pois ocorreu 100% de viabilidade celular. Em relação à infusão (Figura 2), observou-se que a partir da concentração 25 mg/ml para a variedade Manzanilla, pelo menos 70% das células se mantiveram viáveis, enquanto o mesmo ocorreu para as variedades Picual e Arbequina a partir da concentração 12,5 mg/ml. Para as demais variedades, as infusões mantiveram pelo menos 70% das células viáveis a partir da concentração 6,25 mg/ml.

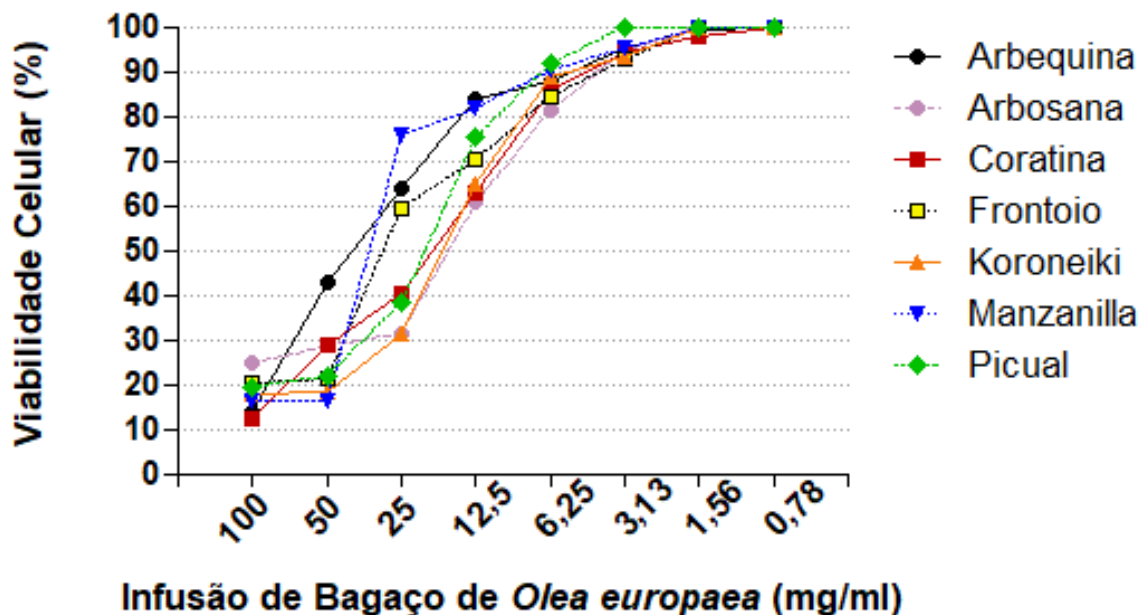
Considerando que as concentrações necessárias para conferir ação antifúngica nas decocções contra *Candida* spp. foi de 25 a 100 mg/mL, esses extratos apresentaram citotoxicidade alta (>75% toxicidade) nessas concentrações, de acordo com a classificação de Mahmoud et al (2011). Contudo, é necessário observar que a avaliação da citotoxicidade se dá pela ação direta e sem qualquer interferência dos extratos nas células, podendo essa toxicidade ser superestimada (Reichling et al., 2009).

Figura 1 – Viabilidade de células MDBK frente à decocção do bagaço de sete diferentes variedades de oliveira (*Olea europaea* L.): Arbequina, Arbosana, Coratina, Frontoio, Koroneiki, Manzanilla e Picual.



Fonte: Autores.

Figura 2 – Viabilidade de células MDBK frente à infusão do bagaço de sete diferentes variedades de oliveira (*Olea europaea* L.) - Arbequina, Arbosana, Coratina, Frontoio, Koroneiki, Manzanilla e Picual.

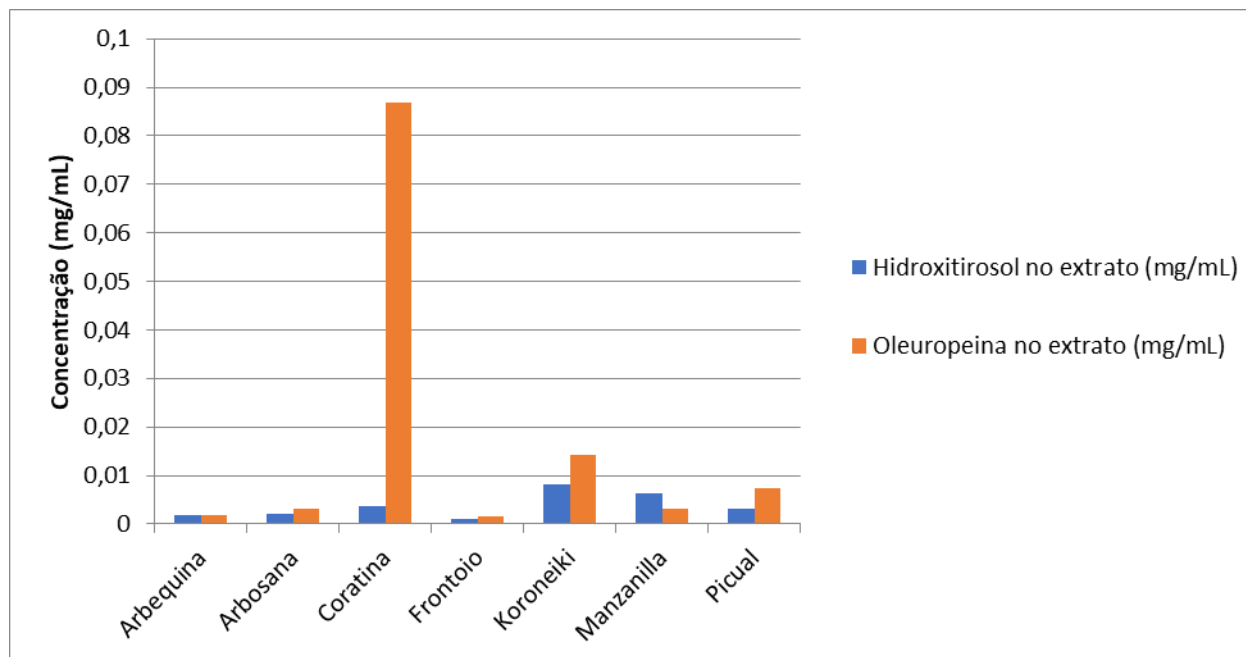


Fonte: Autores.

Os compostos químicos explorados através da CLAE foram oleuropeína e hidroxitirosol, que de acordo com a literatura são os compostos fenólicos presentes nos extratos que interferem na ação antimicrobiana. Hidroxitirosol foi encontrado em diferentes concentrações nos extratos, variando de 8×10^{-4} a 34×10^{-4} mg/ml em INF 10' e de 11×10^{-4} a 81×10^{-4} mg/ml em DEC 10'.

A oleuropeína é um secoiridoide presente majoritariamente em folhas de *Olea europaea*, estudos estimam que pode variar de 60-90mg/g sua concentração em matéria seca folhar (El & Karakaya 2009), porém o presente estudo demonstrou que no bagaço, a partir de extração aquosa, essas concentrações são extremamente menores, variando de 7×10^{-3} a 87×10^{-3} mg/ml em DEC 10' (Figura 3), destacando as variedades coratina, koroneiki e picual possuindo maior concentração (0,030 a 0,087mg/ml). Já em INF 10' foi detectada em concentrações variando de 1×10^{-3} a 8×10^{-3} mg/ml, e ausência do composto nas variedades arbosana, arbequina, frontoio e manzanilla

Figura 3 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de extratos de bagaço decocção (DEC10') de oliveira (*Olea europaea* L.).



Fonte: Autores.

A quantidade dos compostos fenólicos encontrados parece interferir na atividade antimicrobiana, onde os extratos de DEC 10' que possuíam maior quantidade de oleuropeína, variando de 87×10^{-3} a 7×10^{-3} mg/ml, foram os extratos que melhor inibiram os isolados e que também apresentam ação antifúngica. Já os compostos que obtiveram concentração de oleuropeína menor que 2×10^{-3} mg/ml não apresentaram atividade.

Considerar o tipo de extrato é importante, pois os mesmos podem variar na constituição e quantidade de composto presente, dependente do tipo de extração utilizada entre outros fatores de acordo com características da planta, solo, umidade, colheita, e época do ano. 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 de alguns autores verificarem atividade antimicrobiana do produto enquanto outros não (Presti et al., 2017).

Assim, pressupõe-se que, entre outros fatores, os extratos de bagaço de *O. europaea* testados não apresentaram atividade antifúngica por já terem passado por diversos processos de extração, obtendo assim menor teor de compostos bioativos (Goldsmith et al., 2014; Nunes et al., 2018) devido a esses processamentos realizados no produto inicial e também a baixa concentração inicial utilizada nos testes.

Segundo a literatura até então consultada, não foram encontradas referências sobre a utilização de extratos aquosos a partir do bagaço (matéria resultante do processamento da indústria do azeite) frente à fungos, portanto é um estudo pioneiro, sendo o primeiro a utilizar esse tipo de substrato da olivicultura para realização dos testes de sensibilidade *in vitro* e também em testes de citotoxicidade celular. Conforme os resultados obtidos, o aproveitamento do bagaço residual na indústria de azeites de olivas não foi válido para uso antifúngico contra isolados fúngicos de *Sporothrix brasiliensis* sp. e *Microsporum* sp., embora tenha sido parcialmente ativo contra *Candida* spp.

4. Conclusão

O estudo demonstra que o extrato de DEC 10' foi efetivo frente a duas cepas padrões de *C. albicans*, a partir de concentrações de 3,12mg/ml, apesar de não possuir valor estatístico, pode-se aprimorar as concentrações utilizadas, visto que

na comparação de extratos os efetivos foram o que obtiveram maiores concentrações de oleuropeína, demonstrada pela CLAE.

Verificou-se que os extratos aquosos de bagaço a 10 minutos de *O. europaea* não foram eficientes para eliminar e/ou inibir o crescimento fúngico frente a isolados de dermatófitos e de *Sporothrix* spp. A viabilidade celular variou de 15 a 50% em extratos de DEC 10' com concentrações a partir de 25mg/ml, que foi efetivo frente a duas cepas. Os extratos de INF 10' não inibiram os isolados em nenhuma das concentrações testadas (de 100 a 0,078 mg/ml) apesar de apresentarem oleuropeína e hidroxitirosol (exceto nas variedades arbequina, arbosana, frontoio e manzanilla em que não revelaram presença de oleuropeína). Nos extratos de DEC 10' obteve-se concentrações de oleuropeína de 7×10^{-3} a 87×10^{-3} mg/mL, O hidroxitirosol variou em 8×10^{-4} a 34×10^{-4} mg/ml nos extratos de INF 10' e de 11×10^{-4} a 81×10^{-4} mg/ml em extratos de DEC 10'. A partir de mais estudos e através da calibração das concentrações os extratos aquosos de bagaço podem ser promissores e auxiliar em terapias antifúngicas, não só pela sua atividade antimicrobiana, mas também outras atividades benéficas dos extratos e para devida inserção dos extratos de *Olea europaea* L., os testes *in vivo* utilizando modelos experimentais são necessários para dar continuidade do estudo da oliveira avançando para possível utilização terapêutica.

Agradecimentos

Agradecimentos à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) por apoio financeiro e tecnológico a partir da bolsa de Doutorado para desenvolvimento do projeto. Também à Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e a Unidade da Favet de Micologia (MicVet - UFPel) que além dos materiais e laboratório, foi contemplada com projeto PQ do CNPq que possibilitou e viabilizou o andamento desse estudo.

Referências

- Battinelli, L., Daniele, C., Cristiani, M., Bisignano, G., Saija, A., & Mazzanti, G. (2006). In vitro antifungal and anti-elastase activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L. fruit. *Phytomedicine*, 13(8), 558-563.
- Bisignano, G., Laganà, M. G., Trombetta, D., Arena, S., Nostro, A., Uccella, N., & Saija, A. (2001). In vitro antibacterial activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L. *FEMS Microbiology Letters*, 198(1), 9-13.
- Boateng, L., Ansong, R., Owusu, W., & Steiner-Asiedu, M. (2016). Coconut oil and palm oil's role in nutrition, health and national development: A review. *Ghana Medical Journal*, 50(3), 189-196.
- Böhmer, B. W. (2018). Potencial antimicrobiano e antitumoral de compostos fenólicos extraídos do bagaço oriundo da obtenção de azeite de oliva (*Olea europaea* L.) (Master's thesis, Universidade Federal de Pelotas).
- Bubonja-Sonje, M., Giacometti, J., & Abram, M. (2011). Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry*, 127(4), 1821-1827.
- Cesar, K. K. F. A., Batista, A. K. R., Paula, L. R., da Silva, R. T., & da Silva, F. L. (2021). Ação antifúngica de extratos e frações de *Annona muricata* L. sobre *Candida* spp. *Research, Society and Development*, 10(5).
- Coelho, J. L. G., Saraiva, E. M. S., de Carvalho Mendes, R., & de Santana, W. J. (2020). Dermatófito: resistência a antifúngicos. *Brazilian Journal of Development*, 6 (10), 74675-74686.
- Coutinho, E. F., Ribeiro, F. C., & Cappellaro, T. H. (2009). Cultivo de oliveira (*Olea europaea* L.). *Embrapa Clima Temperado-Sistema de Produção (INFOTECA-E)*.
- Coutinho, E. F. (Ed.). (2015). Cultivares. Oliveira: aspectos técnicos e cultivo no sul do Brasil. *Embrapa*. 58 – 85.
- Cowen, L. E., Sanglard, D., Howard, S. J., Rogers, P. D., & Perlin, D. S. (2015). Mechanisms of antifungal drug resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(7), a019752.
- Crawford, A., & Wilson, D. (2015). Essential metals at the host-pathogen interface: nutritional immunity and micronutrient assimilation by human fungal pathogens. *FEMS Yeast Research*, 15(7).
- El, S. N., & Karakaya, S. (2009). Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutrition reviews*, 67(11), 632-638.
- Ferreira, W. A., Aguiar, G. S., Pessoa, H. R., da Costa, D. C. F., & Zago, L. (2021). Potencial antitumoral dos compostos fenólicos de produtos da oliveira (*Olea europaea* L.): uma revisão integrativa da literatura. *Research, Society and Development*, 10(13).

- Furneri, P. M., Marino, A., Saija, A., Uccella, N., & Bisignano, G. (2002). In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 20(4), 293-296.
- Gandul-Rojas, B., & Mínguez-Mosquera, M. I. (1996). Chlorophyll and carotenoid composition in virgin olive oils from various Spanish olive varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72(1), 31-39.
- Giuffrida, D., Salvo, F., Salvo, A., La Pera, L., & Dugo, G. (2007). Pigments composition in monovarietal virgin olive oils from various sicilian olive varieties. *Food Chemistry*, 101(2), 833-837.
- Goldsmith, C. D., Stathopoulos, C. E., Golding, J. B., & Roach, P. D. (2014). Fate of the phenolic compounds during olive oil production with the traditional press method. *International Food Research Journal*, 21(1).
- Gupta, A. K., & Cooper, E. A. (2008). Update in antifungal therapy of dermatophytosis. *Mycopathologia*, 166(5), 353-367.
- Johann, S., Pizzolatti, M. G., Donnici, C. L., & Resende, M. A. D. (2007). Antifungal properties of plants used in Brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(4), 632-637.
- Korukluoglu, M., Sahan, Y., Yigit, A., & Karakas, R. (2006). Antifungal activity of olive leaf (*Olea Europaea* L.) extracts from the Trilye region of Turkey. *Annals of Microbiology*, 56(4), 359-362.
- Lacaz, C. D. S., & Del Negro, G. (1994). Drogas antifúngicas: Terapêutica das micoses. In *Farmacologia*. 1156-90.
- Lee, O. H., & Lee, B. Y. (2010). Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource Technology*, 101(10), 3751-3754.
- Luchetti, F. (2002). Importance and future of olive oil in the world market—An introduction to olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9-10), 559-563.
- Markin, D., Duek, L., & Berdicevsky, I. (2003). In vitro antimicrobial activity of olive leaves. Antimikrobielle Wirksamkeit von Olivenblättern in vitro. *Mycoses*, 46(3-4), 132-136.
- Martiny, T., Ribeiro, P. B., Da Rosa, G. S., & Moraes, C. C. (2016). Atividade Antimicrobiana de Extratos Foliare de *Olea europaea* L. *Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão*, 8(4).
- Meireles, M. C. A., & Nascente, P. D. S. (2009). Micologia Veterinária. Ed. *Universitária UFPEL*, 456.
- Mahmoud, T. S., Marques, M. R., Pessoa, C. D. Ó., Lotufo, L. V., Magalhães, H. I., Moraes, M. O. D. & Oliveira, J. E. D. (2011). In vitro cytotoxic activity of Brazilian Middle West plant extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21, 456-464.
- Mukherjee, P. K., Leidich, S. D., Isham, N., Leitner, I., Ryder, N. S., & Ghannoum, M. A. (2003). Clinical Trichophyton rubrum strain exhibiting primary resistance to terbinafine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(1), 82-86.
- NCCL (2002). Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos.
- Nunes, M. A., Costa, A. S., Bessada, S., Santos, J., Puga, H., Alves, R. C. & Oliveira, M. B. P. (2018). Olive pomace as a valuable source of bioactive compounds: A study regarding its lipid-and water-soluble components. *Science of the Total Environment*, 644, 229-236.
- Odds, F. C., Brown, A. J., & Gow, N. A. (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in Microbiology*, 11(6), 272-279.
- Papon, N., Courdavault, V., Clastre, M., & Bennett, R. J. (2013). Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. *PLoS Pathog*, 9(9), e1003550.
- Pereira, A. P., Ferreira, I. C., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P. B., Seabra, R. & Pereira, J. A. (2007). Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*, 12(5), 1153-1162.
- Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J., & Shitsuka, R. (2018). Metodologia da pesquisa científica. [e-book]. Santa Maria. Ed (pp. 3-9). *UAB/NTE/UFSM*. Disponível em: https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf.
- Pillar, V. D. P., Müller, S. C., Castilhos, Z. M. S., Jacques, A. V. A. (2009). Campos Sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade. *Ministério do Meio Ambiente*.
- Presti, G., Guarrasi, V., Gulotta, E., Provenzano, F., Provenzano, A., Giuliano, S., Giacomazza, D. (2017). Bioactive compounds from extra virgin olive oils: Correlation between phenolic content and oxidative stress cell protection. *Biophysical Chemistry*, 230, 109-116.
- Poester, V. R., Mattei, A. S., Madrid, I. M., Pereira, J. T. B., Klafke, G. B., Sanchotene, K. O. & Xavier, M. O. (2018). Sporotrichosis in Southern Brazil, towards an epidemic? *Zoonoses and Public Health*, 65(7), 815-821.
- Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., & Saller, R. (2009). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties—an overview. *Complementary Medicine Research*, 16(2), 79-90.
- Reis - Gomes, A. D. (2012). Estudo retrospectivo das micoses e micotoxicoses animais na região sul do Brasil. *Tese Mestrado*, 96.
- Rodrigues, A. M., De Hoog, G., Zhang, Y., & De Camargo, Z. P. (2014). Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. *Emerging Microbes & Infections*, 3(1), 1-10.

- Rondón Medina, K. J., & Centy Rodríguez, M. F. (2022). Actividad Antiinflamatoria de la Crema elaborada con el Extracto Etanólico de *Olea europaea* L. (Olivo) en *Rattus norvegicus* var. Albinus con edema plantar inducido.
- Salama, Z. A., Aboul-Enein, A. M., Gaafar, A. A., Asker, M. S., Aly, H. F., & Ahmed, H. A. (2020). In-vitro antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of banana leaves (*Musa acuminata*) and olive leaves (*Olea europaea* L.) as by-products. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 13(2), 687-696.
- Romero, C., Medina, E., Vargas, J., Brenes, M., & De Castro, A. (2007). In vitro activity of olive oil polyphenols against *Helicobacter pylori*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), 680-686.
- Şahin, S., Samli, R., Tan, A. S. B., Barba, F. J., Chemat, F., Cravotto, G., & Lorenzo, J. M. (2017). Solvent-free microwave-assisted extraction of polyphenols from olive tree leaves: Antioxidant and antimicrobial properties. *Molecules*, 22(7), 1056.
- Stopiglia, C. D. O., Magagnin, C. M., Castrillón, M. R., Mendes, S. D. C., Heidrich, D., Valente, P., & Scroferneker, M. L. (2013). Antifungal susceptibilities and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil. *Medical Mycology*, 52(1), 56-64.
- Sudjana, A. N., D'Orazio, C., Ryan, V., Rasool, N., Ng, J., Islam, N., Hammer, K. A. (2009). Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(5), 461-463.
- Upadhyay, R. K. (2014). Evaluation of antibacterial and antifungal activities of olive (*Olea europaea*) essential oil. *International Journal of Green Pharmacy (IJGP)*, 8(3).
- Vieira, A. J. H., & Santos, J. I. (2017). Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. *RBAC*, 49(3), 235-9.
- Zacchino, S. (2001). Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. *Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna*. Chapecó: Ed. Argos, 435-479.
- Waller, S. B., Madrid, I. M., Ferraz, V., Picoli, T., Cleff, M. B., de Faria, R. O., de Mello, J. R. B. (2016). Cytotoxicity and anti-*Sporothrix brasiliensis* activity of the *Origanum majorana* Linn. oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 896-901.
- Waller, S. B., Cleff, M. B., Serra, E. F., Silva, A. L., dos Reis Gomes, A., de Mello, J. R. B., Meireles, M. C. A. (2017). Plants from Lamiaceae family as source of antifungal molecules in humane and veterinary medicine. *Microbial Pathogenesis*, 104, 232-237.
- Waterman, E., & Lockwood, B. (2007). Active components and clinical applications of olive oil. *Alternative Medicine Review*, 12(4).