

Atividade in vitro de extratos das variedades Arbequina e Picual de *Olea europaea* L. frente a *Candida* sp., *Microsporium gypseum* e *Sporothrix brasiliensis*

In vitro activity of extracts of Arbequina and Picual varieties of *Olea europaea* L. in front *Candida* sp., *Microsporium gypseum* and *Sporothrix brasiliensis*

Actividad in vitro de extractos de las variedades Arbequina y Picual de *Olea europaea* L. en contra *Candida* sp., *Microsporium gypseum* y *Sporothrix brasiliensis*

Recebido: 31/08/2022 | Revisado: 17/09/2022 | Aceitado: 18/09/2022 | Publicado: 25/09/2022

Otávia de Almeida Martins

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

Márcia Kutscher Ripoll

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

Luiza da Gama Osório

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4067-7713>
Universidade Federal de Pelotas, Brasil
E-mail: luizaosorio@yahoo.com

Angelita dos Reis Gomes

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

Renata Osório de Faria

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

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

Mário Carlos Araújo Meireles

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

Resumo

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma planta frutífera, nativa das regiões tropicais e temperadas e uma das mais antigas cultivadas. O uso de extratos vegetais de conhecida atividade antimicrobiana podem adquirir significado nos tratamentos terapêuticos. O objetivo do trabalho é avaliar a atividade antifúngica dos resíduos da indústria de Oliveiras (bagaço) na variedade Picual e de partes vegetativas de cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.) das variedades Arbequina e Picual, frente à *Candida* spp., *Microsporium gypseum* e *Sporothrix brasiliensis*. A metodologia para os testes in vitro foi referenciada pelo documento M27-A3 preconizado pelo CLSI para as leveduras e M38-A2 para fungos filamentosos, adaptados para uso de fitoterápicos. A atividade antifúngica dos extratos hidroalcoólicos de folhas de *Olea europaea* L. se sobressaíram no resultado final, apresentando ação inibitória nas concentrações de 50 mg/ml, 100 mg/ml e 200 mg/ml, seguido do extrato aquoso de decocção nas mesmas concentrações. Os extratos hidroalcoólicos do bagaço da variedade Picual e das folhas das variedades Picual e Arbequina apresentaram atividade fungistática promissora frente aos isolados de *Microsporium gypseum*, apresentando CIM que variaram de 100 mg/ml a 200 mg/ml. Os resultados demonstram potencial desses extratos no tratamento da dermatofitose, porém mais estudos devem ser realizados frente as demais espécies de dermatófitos para comprovação de sua efetividade, além de testes de citotoxicidade. Os extratos de infusão e hidroalcoólicos das folhas da variedade Picual apresentaram maior ação inibitória frente aos isolados de

Candida spp. e *Sporothrix brasiliensis* apresentando parâmetros importantes para apontar os produtos como uma alternativa terapêutica.

Palavras-chave: Antifúngico; Oliveiras; Fungos leveduriformes; Fungos filamentosos.

Abstract

The olive tree (*Olea europaea* L.) is a fruit-bearing plant, native to tropical and temperate regions and one of the oldest cultivated. The use of plant extracts with known antimicrobial activity can acquire meaning in therapeutic treatments. The objective of this work is to evaluate the antifungal activity of residues from the olive industry (bagasse) in the Picual variety and of vegetative parts of olive cultivars (*Olea europaea* L.) of the Arbequina and Picual varieties, against *Candida* spp., *Microsporium gypseum* and *Sporothrix brasiliensis*. The methodology for the in vitro tests was referenced by the document M27-A3 recommended by the CLSI for yeasts and M38-A2 for filamentous fungi, adapted for the use of phytotherapies. The antifungal activity of the hydroalcoholic extracts of leaves of *Olea europaea* L. stood out in the final result, presenting inhibitory action at concentrations of 50 mg/ml, 100 mg/ml and 200 mg/ml, followed by the aqueous decoction extract at the same concentrations. The hydroalcoholic extracts of the bagasse of the Picual variety and the leaves of the Picual and Arbequina varieties showed promising fungistatic activity against the isolates of *Microsporium gypseum*, with CIM ranging from 100 mg/ml to 200 mg/ml. The results demonstrate the potential of these extracts in the treatment of dermatophytosis, but more studies should be carried out against other species of dermatophytes to prove their effectiveness, in addition to cytotoxicity tests. The infusion and hydroalcoholic extracts from the leaves of the Picual variety showed greater inhibitory action against *Candida* spp. and *Sporothrix brasiliensis* presenting important parameters to point out the products as a therapeutic alternative.

Keywords: Antifungal; Olive trees; Yeast-like fungi; Filamentous fungi.

Resumen

El olivo (*Olea europaea* L.) es una planta frutal, originaria de las regiones tropicales y templadas y una de las más antiguas cultivadas. El uso de extractos de plantas con conocida actividad antimicrobiana puede adquirir significado en tratamientos terapéuticos. El objetivo de este trabajo es evaluar la actividad antifúngica de residuos de la industria del olivo (bagazo) en la variedad Picual y de partes vegetativas de cultivares de olivo (*Olea europaea* L.) de las variedades Arbequina y Picual, frente a *Candida* spp., *Microsporium gypseum* y *Sporothrix brasiliensis*. La metodología para los ensayos in vitro estuvo referenciada por el documento M27-A3 recomendado por el CLSI para levaduras y M38-A2 para hongos filamentosos, adaptados para el uso de fitoterapéuticos. En el resultado final se destacó la actividad antifúngica de los extractos hidroalcohólicos de hojas de *Olea europaea* L., presentando acción inhibitoria a las concentraciones de 50 mg/ml, 100 mg/ml y 200 mg/ml, seguido del extracto acuoso en decocción a las mismas concentraciones. Los extractos hidroalcohólicos del bagazo de la variedad Picual y de las hojas de las variedades Picual y Arbequina mostraron una prometedora actividad fungistática frente a los aislados de *Microsporium gypseum*, con CIM que oscilaron entre 100 mg/ml y 200 mg/ml. Los resultados demuestran el potencial de estos extractos en el tratamiento de la dermatofitosis, pero se deben realizar más estudios contra otras especies de dermatofitos para comprobar su eficacia, además de pruebas de citotoxicidad. La infusión y los extractos hidroalcohólicos de las hojas de la variedad Picual mostraron mayor acción inhibitoria frente a *Candida* spp. y *Sporothrix brasiliensis* presentando parámetros importantes para señalar los productos como alternativa terapéutica.

Palabras clave: Antifúngico; Olivos; Hongos levadura; Hongos filamentosos.

1. Introdução

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma planta frutífera, da família botânica *Oleaceae* (Coutinho et al., 2009) nativa das regiões tropicais e temperadas do mundo, é uma das plantas cultivadas mais antigas, sendo o Mediterrâneo a principal região produtora desta cultura, cerca de 98% (Vogel et al., 2014; Özcan & Matthäus, 2017). Ao longo dos anos, muitas cultivares de azeitonas foram desenvolvidas para se adequar as condições de cultivo, sendo que as quatro principais cultivares para produção de azeite são: Koroneike na Grécia, Frantoio na Itália, Arbequina na Espanha e Mission nos Estados Unidos da América (Kostelenos & Kiritsakis, 2017). No país a cultura da oliveira se instalou inicialmente no sul e sudeste e em 1948 foi oficialmente introduzida no Rio Grande do Sul, através da criação do órgão especializado da Secretaria da Agricultura (serviço oleícola), com a finalidade de superintender e orientar os trabalhos de fomento e pesquisa (Embrapa, 2012). Com o passar dos anos, alguns pioneiros plantaram em Uruguaiana/RS olivais, com mudas oriundas da Argentina com assistência técnica argentina e brasileira. Posterior a este fato, a Secretaria de Agricultura local se interessou pela oliveira e incentivou à implantação de grandes olivais

em vários pontos do território gaúcho, destacando-se a Região da Campanha Gaúcha (Caçapava do Sul, Dom Pedrito e Candiota) (Teramoto et al., 2010).

A olivicultura está em constante expansão no Brasil, a expectativa do setor é de que até 2025 a área de cultivo alcance 20.000 hectares. Caracterizado como um dos principais importadores, nosso país adquire mais de R\$ 1 bilhão por ano em azeitonas e azeites, sendo o mercado consumidor brasileiro uma grande oportunidade para os produtores rurais. Segundo estimativas do Instituto Brasileiro de Olivicultura, no RS a área implantada passou de 5.500 ha em 2020 para 7.000 ha em 2021, correspondendo a cerca de 70% das áreas plantadas no Brasil. Na safra 2021, o estado produziu 1.800 toneladas, atingindo o recorde de 202.000 litros de azeite, produzidos nas 15 indústrias de azeite localizadas no estado (Ibraoliva, 2021). A cadeia produtiva da olivicultura no Rio Grande do Sul está organizada e conta com a Câmara Setorial e o fundo de desenvolvimento e hoje no estado contamos com 160 produtores que cultivam aproximadamente 4.800 hectares, extraem 50 mil litros de azeite, processado em doze indústrias que comercializam 26 diferentes marcas (Ibraoliva, 2020).

No Brasil as condições tropicais, favorecem o crescimento vegetativo da planta, o que faz com que especialmente nas épocas de podas, gere-se muita folha, obtidas por este processo de manejo do olival, com baixo índice de aproveitamento. As folhas dessa planta são consideradas um subproduto gerado em grande quantidade (Guinda et al., 2004). A exploração industrial das folhas pode representar uma opção de valorização do plantio de oliveiras, devido ao aumento da demanda por produtos naturais por diversos segmentos industriais, como alimentício e farmacêutico (Fernández-Bolaños et al., 2006; Guinda, 2006; Roig et al., 2006).

O uso de extratos vegetais e fitoquímicos de conhecida atividade antimicrobiana podem adquirir significado nos tratamentos terapêuticos. Desenvolvem-se inúmeros estudos, em diferentes países, para comprovar-lhes a eficácia (Nunan et al., 1985; Locher et al., 1995; Annapurna et al., 1999; Djipa et al., 2000; Feresin et al., 2001; Khan et al., 2001; Ramesh et al., 2002). Muitas espécies vegetais têm sido usadas, pelas características antimicrobianas, através de compostos sintetizados pelo metabolismo secundário da planta. Estes produtos são reconhecidos por suas substâncias ativas, como é o caso dos compostos fenólicos, que fazem parte dos óleos essenciais e dos taninos (Nascimento et al., 2000).

A literatura relata extratos aquosos, alcoólicos e hidroalcoólicos em diversas proporções, feitos a partir de folhas verdes ou secas, de casca, de frutos, de sementes e, até mesmo, de botões florais. O uso de solventes hidroalcoólicos, obtidos a partir de diferentes proporções de água e etanol é eficiente para a extração bruta de taninos e saponinas (Falkenberg et al., 2002). O interesse dos investigadores por fontes naturais de compostos com propriedades biológicas específicas, aumenta devido à crescente suspeita de efeitos secundários e toxicidade de antioxidantes sintéticos e agentes antimicrobianos (Aytul, 2010), assim, devido às possíveis propriedades benéficas das folhas de oliveira, associado à necessidade de valorizar seu uso, é importante estudar seu real potencial biológico (Benavente-García et al., 2000). Essas folhas já são usadas para fins medicinais, como o combate a febres, além disso, reconhecidamente possuem em sua composição um composto fenólico chamado oleuropeína, garantindo as folhas propriedades antimicrobianas, potencial antioxidante e antimicrobiano, porém o modo de ação do extrato bruto da folha de oliveira sobre patógenos ainda não está claro (Pacetta, 2013; Liu et al., 2017). Estudos já relataram atividade antimicrobiana de *Olea europaea* L. contra bactérias, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp., entre outras (Sudjana et al., 2009; Rafiei et al., 2012; Ghomari et al., 2019; Bayram et al., 2020).

O uso de plantas medicinais devido a resistência às drogas na terapia antifúngica está assumindo cada vez mais importância, como uma abordagem para melhorar a eficácia de agentes antifúngicos e reduzir os níveis de resistência (Donadu et al., 2021). As infecções fúngicas ou micoses são doenças causadas pelo desenvolvimento e multiplicação de fungos patogênicos primários ou oportunistas em diferentes órgãos (Vandeputte et al., 2012). A maioria dos patógenos primários são

fungos filamentosos, capazes de estabelecer uma infecção em indivíduos saudáveis. Enquanto que a maioria dos oportunistas são leveduras e algumas espécies de fungos filamentosos, capazes de estabelecer infecção devido a suscetibilidade do paciente (Carvalho, 2016). O uso de plantas medicinais no combate dessas micoses é uma prática comum visando conhecer o perfil de sensibilidade e resistência de fungos leveduriformes e filamentosos a extratos vegetais de plantas medicinais (Barbosa Júnior et al., 2015).

A *Candida albicans* é um fungo comensal comum que coloniza a cavidade orofaríngea, trato gastrointestinal, trato vaginal e a pele de indivíduos saudáveis. Em 50% da população, *C. albicans* faz parte da flora normal da microbiota (Colombo & Guimarães, 2003). As várias manifestações clínicas das espécies de *Candida* variam de distúrbios mucocutâneos superficiais localizados a doenças invasivas que envolvem múltiplos sistemas orgânicos e são fatais. Diferentes drogas antifúngicas, como por exemplo, polienos (nistatina), imidazol (clotrimazol) e clorexidina (classe clorexidina), são usadas no tratamento de infecções por *Candida* spp. Embora esses medicamentos sejam eficazes contra essa infecção, podem por vezes apresentar efeitos colaterais desfavoráveis dependendo da frequência e tempo de utilização (Talapko et al., 2021).

Os dermatófitos são fungos filamentosos, hialinos, queratinofílicos, capazes de causar patologias em homens e animais (Agrawal et al., 2021). Estudos epidemiológicos mostram que a distribuição de dermatófitos isolados de espécimes clínicos sofreram mudanças, tendo como fatores contribuintes para essas alterações, as condições socioeconômicas e climáticas de cada região (Ebrahimi et al., 2019). Apesar dos tratamentos disponíveis, o surgimento de novos casos e de recorrência dessa infecção se tornou um problema de saúde pública (Nweze & Eke, 2018; Pereira et al., 2020; Rengasamy et al., 2020). Estudos apontam aumento na incidência de casos de dermatofitose crônica e recorrentes sem resposta ao tratamento pelos antifúngicos, como fluconazol e terbinafina (Dogra & Uprety, 2016; Joshi et al., 2020).

A esporotricose é uma micose de implantação causada por espécies do complexo *Sporothrix schenckii* (Vásquez-del-Mercado et al., 2012). No Brasil, 96,9% dos casos são causados por *Sporothrix brasiliensis*, responsável por uma infecção zoonótica transmitida de gatos infectados para humanos por meio de mordidas, arranhões ou contato com exsudato das lesões cutâneas de gatos doentes (Rodrigues et al., 2013; Rossow et al., 2020). A esporotricose tem como tratamento padrão os antifúngicos, sendo que para cães e gatos o itraconazol é recomendado como primeira opção (Gremião et al., 2021). Entretanto, muitos casos são comprovadamente refratários ao antifúngico convencional, assim é crescente o número de casos com falhas terapêuticas. Vários fatores podem comprometer a cura clínica, como escolha do medicamento e doses terapêuticas (Kinnisson et al., 2015). A resistência pode ser oriunda das características do agente etiológico como o dimorfismo e a concentração de melanina na parede celular, fatores que são associados não apenas à virulência, mas também a um aumento na resistência a drogas antifúngicas (Almeida-Paes et al., 2009; Mario et al., 2016; Sanchotene et al., 2017).

É com base na busca por novas substâncias e no crescente surgimento de micro-organismos resistentes aos fármacos, além das questões limitantes relacionadas a terapêutica antifúngica, que justificam a realização do presente estudo o qual busca avaliar a atividade antifúngica dos resíduos da indústria de oliveiras (bagaço) na variedade Picual e de partes vegetativas de cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.) das variedades Arbequina e Picual, frente à *Candida* spp., *Microsporium gypseum* e *Sporothrix brasiliensis*.

2. Metodologia

A pesquisa foi realizada por ensaio laboratorial e desenvolvida no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária – MicVet, da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), abordando o modo quantitativo (Pereira et al., 2018). A partir de testes de extratos aquosos e hidroalcolico derivados de bagaço e das folhas secas de oliveiras, coletados no município de Pinheiro Machado, estado do Rio Grande do Sul, Brasil, frente à isolados fúngicos de interesse.

2.1 Preparação dos extratos vegetais

As folhas de oliveira das variedades Arbequina e Picual e o bagaço dos frutos da variedade Picual utilizadas no experimento foram cedidas de uma propriedade no município de Pinheiro Machado (31°29'59,4" S e 53°30'32,7" W), estado do Rio Grande do Sul, Brasil. O bagaço foi coletado nos meses de janeiro e fevereiro dos anos de 2018 e 2019 e as folhas nos meses de julho e agosto dos anos de 2018, 2019 e 2021, posteriormente as folhas foram colocadas para secagem em estufa à 40°C.

Os extratos aquosos derivados de bagaço de oliveira (variedade Picual) e das folhas secas de oliveiras (variedades Arbequina e Picual), foram divididos em decocção (líquido extrator entra em ebulição em contato com a planta) e infusão (água fervente é adicionado à planta) por dez minutos, posteriormente foram filtrados (papel filtro gramatura 1 - 70mm, Whatman™) para retirada da matéria sólida e, em seguida, armazenados em recipiente de vidro âmbar sob refrigeração até a realização das análises.

Para os extratos hidroalcóolico do bagaço de oliveira (variedade Picual) e das folhas secas de oliveira (variedades Arbequina e Picual), foram preparados por meio de uma técnica de extração simples com solvente, aos quais foram utilizadas 20,0 g e adicionados 100 ml de álcool cereal (álcool etílico hidratado com base alguns tipos de cereais como o milho, arroz e trigo). Os extratos foram filtrados e armazenado em vidro âmbar sob refrigeração até a realização das análises.

2.2 Isolados Fúngicos

No estudo foram utilizados 15 isolados de *Candida* spp., dentre eles duas cepas padrões (*C. albicans* – ATCC America Type Cultura Collection – 14053 e IOC Instituto Oswaldo Cruz – 3691), sete isolados de *Microsporium gypseum* e 15 isolados de *Sporothrix brasiliensis* estocados na micoteca do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária – Micet, da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), provenientes de casos clínicos de cães e gatos. Todos isolados utilizados foram identificados macro e micromorfologicamente. Os isolados de *Candida* spp. foram analisados no Vitek MS IVD system® (bioMérieux; Marcy l'Etoile, France), e para identificação dos isolados de *S. Brasilienses* foi realizado sequenciamento genético.

O estoque foi recuperado e mantido sob refrigeração entre 4 a 8°C durante seu uso no experimento. Para os testes as culturas foram repicadas em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol, incubadas, analisadas para comprovar pureza, viabilidade das colônias e mantidos a temperatura ideal para cada gênero fúngico.

2.3 Testes de microdiluição em caldo

O método de diluição em caldo considera a relação entre a proporção de crescimento do microrganismo testado no meio líquido e a concentração da substância ensaiada, fornecendo resultados quantitativos (Pinto et al., 2003). Sendo assim, os testes de suscetibilidade foram realizados segundo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2020) através do protocolo M27-A3 para fungos leveduriformes e seguindo protocolo M38-A2, para fungos filamentosos, adaptados para uso de fitoterápicos (NCCLS, 2002; Aly et al., 2018; Aree & Jongrungruangchok, 2018).

Antecedendo o teste, como preconiza o CLSI, foram realizados os inóculos a partir dos fungos a serem testados. A solução foi homogeneizada e colocada em espectrofotômetro (UV) visível para realizar a medida de absorvância no comprimento de onda de 530 nm. A avaliação do efeito antifúngico dos extratos do bagaço e das folhas de oliveira foram realizadas pelo método de microdiluição em caldo utilizando microplacas estéreis de 96 poços de fundo chato (8 linhas A-H/1-12 colunas).

Os testes foram realizados em triplicata, onde se estipulou controle positivo na coluna A e controle negativo na coluna H. Nos outros poços (de B a G), foram acrescentados 100µL, no primeiro poço-teste, do produto a ser testado e realizada diluições seriadas. Posteriormente, foram acrescentados 100 µL do inóculo diluído em Sabouraud líquido e solução salina para isolados de dermatófitos, enquanto para *Sporothrix brasiliensis* e isolados/cepas de *Candida* sp. foram diluídos em meio RPMI-1640

acrescido de tampão 3-N-ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) e solução salina, permitindo a avaliação das concentrações de 200 mg/ml, 100 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml, 12,5 mg/ml e 6,25 mg/ml.

As placas foram incubadas em estufa, de acordo com a temperatura ideal de crescimento de cada fungo, até a realização da leitura da concentração inibitória mínima (CIM), que é avaliada através da determinação de uma pequena quantidade da substância necessária para inibir crescimento fúngico, visualmente. Em seguida foi realizada a leitura da concentração fungicida mínima (CFM), através da semeadura de 10 µl de cada poço em placas de Petri adicionadas de ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol, onde considera-se como concentração fungicida mínima as placas onde não houve crescimento fúngico.

3. Resultados e Discussão

A atividade antimicrobiana de *Olea europaea* L. tem sido extensivamente investigada nas últimas quatro décadas. Esses esforços científicos se concentraram principalmente na atividade antimicrobiana global dos extratos brutos contra uma grande variedade de bactérias e alguns fungos (Thielman et al., 2017), obtendo resultados promissores como extratos aquosos de folha de oliveira frente à isolados clínicos de bactérias e fungos filamentosos (Markin et al, 2003) e extratos comerciais de folhas de oliveira frente à bactérias e fungos leveduriforme (Sudjana et al, 2009). A fim de recorrer a novas alternativas para tratamentos de doenças causadas por fungos, plantas com ação medicinal estão sendo testadas devido a sua atual utilização a nível popular, seja em infusões, óleos essenciais e extratos alcoólicos. Sabe-se que os principais compostos que atuam combatendo micro-organismos são os compostos fenólicos, contudo, o extrato em seu conjunto, tem se mostrado mais benéfico que estes compostos isoladamente (Pereira et al., 2007).

Os resultados obtidos de viabilidade dos isolados e cepas frente aos extratos do bagaço das oliveiras (dos anos de 2018 e 2019) e das folhas (dos anos de 2018, 2019 e 2021) testados na concentração fungicida mínima estão descritos nas Tabelas 1 e 2. Nenhum dos extratos, nas concentrações testadas, apresentou ação fungicida quando avaliada a concentração fungicida mínima (CFM).

A partir do bagaço de oliveira da variedade Picual, coletados nos anos de 2018 e 2019, foram testados extratos aquosos (infusão e decocção) e extrato hidroalcoólico frente à 15 isolados de *Candida* spp., sete isolados de *Microsporum gypseum* e 15 isolados de *Sporothrix brasiliensis* (Tabela 1).

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos do bagaço de *Olea europae* L. da variedade Picual frente dos fungos causadores de candidose, dermatofitose e esporotricose, nos anos de 2018 e 2019.

Isolados/cepas	Ano de 2018			Ano de 2019		
	Extratos da variedade Picual (mg/ml)			Extratos da variedade Picual (mg/ml)		
	INF	DEC	HA	INF	DEC	HA
<i>Candida</i> spp. (n=15)						
ATCC 14053 (1)	> 200	100	> 200	100	100	> 200
IOC 3691 (1)	>200	100	>200	100	100	>200
<i>Candida</i> sp. (1)	>200	>200	>200	200	200	>200
<i>Candida</i> sp. (1)	>200	>200	>200	>200	200	>200
<i>Candida</i> sp. (11)	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Dermatófitos (n=7)						
<i>Microsporum gypseum</i> (4)	> 200	> 200	200	> 200	> 200	100
<i>Microsporum gypseum</i> (3)	> 200	> 200	200	> 200	200	100
<i>Sporothrix brasiliensis</i> (n=15)						
<i>Sporothrix</i> sp. (1)	>200	>200	>200	200	200	>200
<i>Sporothrix</i> sp. (1)	200	>200	>200	100	100	>200
<i>Sporothrix</i> sp. (13)	>200	>200	>200	>200	>200	>200

Legenda: INF – Infusão; DEC – Decocção; HA – Hidroalcolico. Fonte: Autores (2022)

Dos 15 isolados de *Candida* spp., as cepas padrão, pertencentes a espécie *albicans*, uma *American Type Culture Collection* 14053 (ATCC) e a outra do Instituto Oswaldo Cruz 3691 (IOC), apresentaram sensibilidade, sendo uma delas suscetível na concentração de 100mg/ml no extrato de decocção no ano de 2018 e a 100mg/ml nos extratos de infusão e decocção do bagaço coletado no ano de 2019. Em 2018 mais nenhum dos isolados apresentaram inibição frente aos extratos testados. Um isolado clínico de *Candida* spp. foi suscetível na concentração de 200 mg/ml no extrato de decocção e um apresentou inibição nos extratos de infusão e decocção na concentração de 200 mg/ml, no ano de 2019. Os demais isolados não foram inibidos nos testes realizados.

Todos os sete isolados de *M. gypseum* foram sensíveis aos extratos hidroalcoólicos do bagaço da variedade Picual, colhido nos anos de 2018 e 2019, sendo inibidos nas concentrações de 200 mg/ml e 100 mg/ml, respectivamente. No ano de 2019, três isolados foram também inibidos na concentração de 200 mg/ml do extrato de decocção. Nos demais extratos não foram verificadas nenhuma ação antifúngica nas concentrações testadas.

Dos 15 isolados de *S. brasiliensis*, um mesmo isolado foi inibido pelo extrato de infusão nas concentrações de 200 mg/ml e 100 mg/ml, do material colhido nos anos de 2018 e 2019, respectivamente, e pelo extrato de decocção, do ano de 2019, também na concentração de 100 mg/ml. Outro isolado apresentou sensibilidade para a concentração de 200 mg/ml nos extratos de infusão e decocção no ano de 2019. Os 13 isolados restantes não apresentaram sensibilidade a nenhum dos extratos testados.

Os testes feitos a partir do bagaço da Oliveira, tiveram baixa ação inibitória frente à maioria dos isolados, porém o extrato hidroalcoólico teve ação inibitória destacada frente ao *M. gypseum*, quando comparado aos demais extratos. Segundo Menz & Vriesekoop (2010) os azeites de oliva apresentam concentração muito menor de compostos fenólicos que o bagaço de azeitona, mesmo considerando o uso dos tratamentos aplicados. Em relação ao bagaço bruto, essa concentração pode ser de 100 vezes menor, a quantidade e o tipo de fenólicos nas azeitonas são influenciados por vários fatores, como a maturidade, a cultivar e o clima e ainda no azeite, pelas condições de processamento, o que irá gerar bagaços com conteúdos variados e redução dos compostos fenólicos configura uma queda na atividade antimicrobiana.

Segundo Korukluoglu et al. (2006) a alta temperatura para obtenção dos extratos aquosos do bagaço interferiria na fração apolar desses compostos, evaporando e por fim não apresentando a atividade esperada. Esse mesmo autor afirma que a obtenção a partir de diversas extrações com outros solventes como álcool, acetona e acetato de etila demonstraram atividade inibitória e antifúngica. 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, devido a esses processamentos realizados no produto inicial e também a baixa concentração utilizada nos testes (Nunes et al., 2018).

A Tabela 2, demonstra os resultados de sensibilidade *in vitro* dos isolados de *Candida* spp., *Microsporium gypseum* e *Sporothrix brasiliensis* frente aos extratos de infusão, decocção e hidroalcoólico das folhas de oliveira das variedades Arbequina colhidas nos anos de 2018 e 2019 e Arbequina e Picual do ano de 2021.

Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos folha de *Olea europae* L. das variedades Arbequina e Picual, frente a isolados/cepas de fungos causadores de candidose, dermatofitose e esporotricose, nos anos de 2018, 2019 e 2021.

Isolados/cepas	Ano 2018			Ano 2019			Ano 2021					
	Extratos da variedade			Extratos da variedade			Extratos da variedade			Extratos da variedade		
	Arbequina (mg/ml)			Arbequina (mg/ml)			Arbequina (mg/ml)			Picual (mg/ml)		
	INF	DEC	HA	INF	DEC	HA	INF	DEC	HA	INF	DEC	HA
<i>Candida</i> spp. (n=15)												
ATCC 14053 (1)	> 200	200	200	> 200	200	200	> 200	> 200	> 200	> 200	100	50
IOC 3691 (1)	> 200	200	200	200	200	200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
<i>Candida</i> sp. (3)	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	100	50
<i>Candida</i> sp. (3)	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	200	200
<i>Candida</i> sp. (3)	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	200
<i>Candida</i> sp. (1)	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	200	> 200
<i>Candida</i> sp. (1)	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	200	100
<i>Candida</i> sp. (2)	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
Dermatófitos (n=7)												
<i>M. gypseum</i> (2)	> 200	> 200	200	> 200	> 200	100	> 200	> 200	200	> 200	> 200	100
<i>M. gypseum</i> (1)	> 200	> 200	200	> 200	> 200	100	> 200	> 200	200	> 200	> 200	200
<i>M. gypseum</i> (1)	> 200	> 200	200	> 200	> 200	100	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
<i>M. gypseum</i> (1)	> 200	> 200	200	200	200	100	> 200	> 200	200	> 200	> 200	200
<i>M. gypseum</i> (1)	> 200	> 200	200	200	200	100	> 200	> 200	200	> 200	> 200	100
<i>M. gypseum</i> (1)	> 200	> 200	200	200	200	100	> 200	> 200	200	> 200	> 200	> 200
<i>Sporothrix brasiliensis</i> (n=15)												
<i>Sporothrix</i> sp. (4)	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
<i>Sporothrix</i> sp. (1)	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	200

<i>Sporothrix</i> sp. (1)	> 200	> 200	> 200	> 200	200	200	> 200	> 200	> 200	> 200	200	100
<i>Sporothrix</i> sp. (1)	> 200	> 200	> 200	> 200	200	200	100	> 200	> 200	> 200	50	200
<i>Sporothrix</i> sp. (1)	> 200	200	> 200	> 200	200	> 200	> 200	200	200	> 200	100	200
<i>Sporothrix</i> sp. (2)	> 200	> 200	200	> 200	200	200	> 200	> 200	> 200	> 200	200	200
<i>Sporothrix</i> sp. (1)	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	200	200
<i>Sporothrix</i> sp. (1)	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	200	200	200	> 200	> 200	200	200
<i>Sporothrix</i> sp. (3)	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	200

Legenda: INF – Infusão; DEC – Decocção; HA – Hidroalcolico. Fonte: Autores (2022)

Nos anos de 2018 e 2019 foram testados extratos aquosos (infusão e decocção) e extrato hidroalcoólico das folhas de oliveira da variedade Arbequina e 2021 os mesmos extratos das folhas de oliveira das variedades Arbequina e Picual, frente aos 15 isolados de *Candida* spp., 7 isolados de *Microsporium gypseum* e 15 isolados de *Sporothrix brasiliensis*.

Dos 15 isolados do gênero *Candida* testados frente aos extratos de folhas de oliveira da variedade Arbequina, somente as cepas padrão de *Candida albicans* apresentaram sensibilidade, foram inibidas na concentração de 200mg/ml no extrato de decocção e no extrato hidroalcoólico do material colhido em 2018. Em 2019, a cepa ATCC apresentou sensibilidade na concentração de 200 mg/ml nos extratos de decocção e hidroalcoólico, já a IOC nos extratos de infusão, decocção e hidroalcoólico na mesma concentração. No ano de 2021 não houve nenhuma ação inibitória dos extratos sobre os isolados. Durante os três anos testados, nenhum dos extratos das folhas da variedade Arbequina apresentou atividade antifúngica frente a isolados provenientes de casos clínicos de *Candida* spp.

O extrato aquoso de decocção das folhas da variedade Picual inibiu 9 (60%) dos 15 isolados de *Candida* spp. (dentre eles a cepa ATCC) em concentrações que variaram de 100 mg/ml a 200 mg/ml. O extrato hidroalcoólico apresentou ação antifúngica em 11 (73,3%) dos 15 isolados da levedura, em concentrações que variaram de 50 mg/ml a 200 mg/ml. Nenhum dos isolados foi sensível ao extrato de infusão das folhas dessa variedade. Estudos confirmam a prerrogativa de que os compostos fenólicos presumivelmente são os que possuem melhor atividade frente à fungos do gênero *Candida* (Batinelli et al., 2006). Markin et al. (2003) relatou que extratos de folha de oliveira com etanol, acetato de etila e acetona inibiram espécies de *C. albicans* em 24h, enquanto o extrato aquoso não exibiu efeitos inibitórios. Korukluoglu e colaboradores (2006), obtiveram resultado positivo com extrato das folhas de *Olea europaea* L. frente à fungos leveduriformes, utilizando a técnica de difusão em disco. Devido à grande variação de compostos majoritários em diferentes extratos, se poderia explicar a divergência dos resultados obtidos em outros estudos (Korukluoglu et al., 2006; Mello & Pinheiro, 2012).

Os isolados de dermatófito *M. gypseum* foram 100% sensíveis ao extrato hidroalcoólico das folhas de oliveira da variedade Arbequina colhidas nos anos de 2018 e 2019, em concentrações que variaram de 100 mg/ml a 200mg/ml, no ano de 2021 apenas um isolado não foi sensível a esse extrato. Os extratos aquosos de infusão e decocção das folhas colhidas no ano de 2019 inibiram apenas três isolados na concentração de 200 mg/ml, o que não ocorreu nos outros anos. Quanto a variedade Picual somente o extrato hidroalcoólico apresentou ação sobre o *M. gypseum*, inibindo cinco (71,4%) dos sete isolados, em concentrações que variaram de 100 a 200 mg/ml.

O extrato hidroalcoólico de folhas da variedade Arbequina colhidas no ano de 2019 inibiu oito (53,3%) dos 15 isolados de *Sporothrix brasiliensis*, situação que não se repetiu nos anos de 2021 e 2018 e, onde respectivamente, somente um e dois isolados foram sensíveis ao extrato. Também no ano de 2019, a ação desse mesmo extrato frente ao *Microsporium gypseum*, inibiu todos os isolados na concentração de 100 mg/ml, enquanto nos outros anos foi necessário o dobro da concentração para obter o mesmo resultado. Em nosso estudo observam-se variações entre extratos e os anos de colheita frente aos mesmos isolados, isso justifica pela qualidade e saúde dos cultivares que foram coletados em anos diferentes. A quantidade e qualidade de compostos bioativos, como a oleuropeína, pode variar por diversos fatores, como variedade do cultivar selecionado, estágio de maturidade da planta e folha, estado fitossanitário, fertilização, período de coleta, índices pluviométricos e condições climáticas (Ranalli et al., 2006; Petridis et al. 2012; Talhaoui et al., 2015). Fennel et al. (2004) cita que as variações referentes à determinação da CIM de extratos de plantas podem ser atribuídas a vários fatores, dentre eles podemos citar a técnica aplicada, o micro-organismo e a cepa utilizada no teste, à origem da planta, a época da coleta, se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de extrato testada. Assim, não existe método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais. Um aspecto bastante relevante na determinação da CIM de extratos vegetais é a

preocupação em relação aos aspectos toxicológicos, microbiológicos e legais pertinentes aos compostos naturais ou suas combinações (Pinto et al., 2003).

Os extratos das folhas da variedade Picual foram os que melhor apresentaram resultados frente ao *Sporothrix brasiliensis*, o extrato hidroalcolóico inibiu 11 (73,3%) dos 15 isolados, em concentrações que variaram de 100 mg/ml a 200mg/ml, enquanto o extrato aquoso de decocção inibiu sete (46,6%) dos isolados, com concentrações de 50 mg/ml a 200mg/ml.

Os extratos hidroalcolóicos das folhas das variedades Arbequina e Picual foram os que apresentaram maior atividade antifúngica frente aos três gêneros fúngicos testados quando em comparação aos extratos aquosos (infusão e decocção), segundo Korukluoglu e colaboradores (2006), que também não obtiveram bons resultados com esses extratos de *Olea europaea* L. frente a leveduras, isso pode ser explicado pelo fato que compostos fenólicos, são fracamente dissolvidos em água devido a sua fração apolar. A redução da capacidade de inibição, apresentada pelos extratos aquosos, pode ser atribuída à volatilização dos constituintes químicos dos extratos e/ou à instabilidade dos mesmos, na presença de luz, calor, ar e umidade. De acordo com Silva (2006), a discrepância entre os resultados obtidos com o uso de extratos vegetais no controle de fitopatógenos justifica-se pela quantidade e composição química variável dos extratos. Leme et al. (2007) verificaram que a forma de esterilização e o tempo de armazenamento dos extratos interfeririam na atividade dos mesmos em relação ao desenvolvimento dos isolados. Isso explica, em parte, o por que ocorre diferença entre os resultados obtidos quando comparados com resultados de pesquisas realizadas em diferentes locais com a mesma metodologia e a mesma espécie de planta.

Apesar do extrato de infusão ser usualmente a forma mais comumente utilizada, os resultados obtidos demonstram que a decocção apresentou mais compostos fenólicos para além de um maior rendimento de extração comparativamente com a infusão o que permite obter uma maior quantidade de compostos bioativos resultante de uma menor quantidade de planta (Caleja, et al. 2017).

Eloff (1998) utilizou a técnica de diluição em microplacas para verificar a atividade antimicrobiana em extratos vegetais e observou inconvenientes na técnica, tais como células de alguns microrganismos que se aderiam à base do poço, enquanto as de outros permaneciam em suspensão. Ainda, compostos presentes em alguns extratos precipitavam, e a coloração verde da clorofila em concentração muito alta interferia na análise. Fatores esses que podem explicar a grande variabilidade de resultados entre isolados de um mesmo gênero fúngico e extratos encontrados em nosso trabalho. Todavia, o mesmo autor salienta que método de microplacas é barato, tem reprodutibilidade, é trinta vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura, requerem pequena quantidade de amostra, e podem ser utilizados para um grande número de amostras deixando um registro permanente.

O trabalho de Pereira et al (2007) mostrou que o uso das folhas de oliveira como nutracêutico pode diminuir o risco de infecções microbianas, particularmente no trato intestinal e respiratório principalmente por causa dos compostos fenólicos. As folhas de oliveira contêm diferentes grupos de componentes tais como: iridóides, polifenóis, flavonas e hidratos de carbono (Le Tutour & Guedon, 1992).

De maneira geral, a capacidade antimicrobiana dos compostos fenólicos é bem conhecida. Nas folhas de oliveira, os polifenóis hidroxitirosol e oleuropeína são os principais compostos fenólicos responsáveis pelas propriedades antimicrobianas (Puupponen-Pimiä et al., 2001; Pereira et al., 2006; Pereira et al., 2007). De acordo com Pereira et al. (2007), a atividade antimicrobiana do extrato aquoso das folhas da oliveira frente as bactérias *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, demonstraram que o extrato possui uma forte atividade inibitória em relação a *E. coli* e *S. aureus* em comparação com os restantes dos micro-organismos patogênicos. Diversos extratos de oliveira já foram testados frente a bactérias e fungos, obtendo resultados promissores como extratos aquosos de folha de oliveira frente isolados clínicos de bactérias e fungos filamentosos (Markin et al, 2003) e extratos comerciais de folhas de

oliveira frente à bactérias e fungos leveduriformes (Sudjana et al, 2009). É importante salientar que, de acordo com o tipo de extrato, as concentrações dos seus constituintes podem variar. Isso justificaria que alguns autores verifiquem atividade antimicrobiana do produto e outros não (Böhmer, 2018).

A atividade antifúngica do extrato hidroalcoólico se sobressaiu no resultado final de todo experimento, apresentando ação inibitória nas concentrações de 50 mg/ml, 100 mg/ml e 200 mg/ml, seguido do extrato aquoso de decocção nas mesmas concentrações e por último o extrato aquoso por infusão nas concentrações de 100 mg/ml e 200 mg/ml. Maria do Socorro et al. (2010) afirma que cada método de análise apresenta particularidades, devido aos diversos tipos de radicais e aos diferentes sítios de ação, assim dificilmente haverá um único teste *in vitro* representativo da verdadeira atividade antioxidante de um composto. O tipo e a polaridade do solvente podem afetar a transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio, que são aspectos chaves na medida da atividade antioxidante, além de que a presença de outros compostos nas soluções testadas também pode afetar os resultados. Assim estes compostos podem estar envolvidos, isoladamente ou em associação, na atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das folhas. Os extratos naturais ricos em compostos fenólicos surgem como alternativas aos óleos essenciais, muito utilizados medicinalmente, mas que, por vezes, têm alguma toxicidade associada (Zapata & Smaghe, 2010; Assis et al., 2011).

4. Considerações Finais

A atividade antifúngica dos extratos hidroalcoólicos de folhas de *Olea europaea* L. se sobressaíram no resultado final de todo experimento, apresentando ação inibitória nas concentrações de 50 mg/ml, 100 mg/ml e 200 mg/ml, seguido do extrato aquoso de decocção nas mesmas concentrações.

Os extratos hidroalcoólicos do bagaço da variedade Picual e das folhas das variedades Picual e Arbequina apresentaram atividade fungistática promissora frente aos isolados de *Microsporum gypseum*, apresentando CIM que variaram de 100 mg/ml a 200 mg/ml. Os extratos de infusão e hidroalcoólicos das folhas da variedade Picual apresentaram maior ação inibitória especialmente frente aos isolados de *Candida* spp. e *Sporothrix brasiliensis* apresentando parâmetros importantes para apontar os produtos como uma alternativa terapêutica após testes de ajuste de concentração e verificação da citotoxicidade, para posterior utilização em modelos *in vivo*, para comprovação de sua efetividade, além de testes de citotoxicidade para avaliar seu uso seguro frente a casos clínicos dessas micoses.

Agradecimentos

Agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro através da concessão de Bolsa de Produtividade em Pesquisa (Processo: 308678/2017-6). Também à Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e ao laboratório de Micologia da Faculdade de Veterinária (MicVet - Favet), que dispôs de recursos e espaço físico para realização do trabalho. Assim como à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pela participação de pós-graduandos no desenvolvimento do projeto.

Referências

- Agrawal, S., Nandeibam, J., & Devi, I. (2021). Danger of exposure to keratinophilic fungi and other dermatophytes in recreational place in the northeast region of India. *Aerobiologia*, 37(4), 755-766.
- Almeida-Paes, R., Frases, S., Monteiro, P. C. F., Gutierrez-Galhardo, M. C., & Zancopé-Oliveira, M. Z. (2009). Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. *Microbes and Infection*, 11(5), 554-562.
- Aly, F. M., Othman, A., & Haridy, M. A. M. (2018). Protective Effects of Fullerene C60 Nanoparticles and Virgin Olive Oil against Genotoxicity Induced by Cyclophosphamide in Rats. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018.

- Annapurna, J., Bhalerao, U. T., & Iyengar, D. S. (1999). Antimicrobial activity of *Saraca asoca* leaves. *Fitoterapia (Milano)*, 70(1), 80-82.
- Aree, T., & Jongrungruangchok, S. (2018). Structure–antioxidant activity relationship of β -cyclodextrin inclusion complexes with olive tyrosol, hydroxytyrosol and oleuropein: Deep insights from X-ray analysis, DFT calculation and DPPH assay. *Carbohydrate Polymers*, 199, 661-669.
- Assis, C., Gondim, M., Siqueira, H., & Câmara, C. (2011). Toxicity of essential oils from plants towards *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) and *Suidasia pontifica* Oudemans (Acari: Astigmata). *Journal of Stored Products Research*, 47(4), 311-315.
- Aytul, K. K. (2010). *Atividades antimicrobianas e antioxidantes do extrato de folha de oliveira e suas aplicações alimentícias*. 102f. (Dissertação Mestrado em Biotecnologia) - Escola de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências do Instituto de Tecnologia de Izmir, Turquia.
- Barbosa Júnior, A. M., Mélo, D. M. D., Almeida, F. D., & Trindade, R. (2015). Estudo comparativo da susceptibilidade de isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice, 1895) frente a alguns antifúngicos de uso hospitalar e extratos vegetais obtidos de plantas medicinais da região semiárida sergipana. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 17(1), 120-132.
- 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.
- Bayram, M., Topuz, S., & Kaya, C. (2020). Antioxidant, antimicrobial activity of olive leaf extract and oleuropein, their possibilities usage in foods. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 8(2), 337-347.
- Benavente-García, O., Castillo, L., Lorente, J., Ortuño, A., & Del Rio, J. A. (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, 68(4), 457-462.
- Böhmer, B. W. (2018). *Potencial antimicrobiano e antitumoral de compostos fenólicos extraídos do bagaço oriundo da obtenção de azeite de oliva (Olea europea L.)*. 77p. (Dissertação Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- Caleja, C., Barros, L., Oliveira, M. B. P. P., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Caracterização do perfil fenólico de extratos aquosos de *Matricaria recutita* L. obtidos por decocção. *Revista de Ciências Agrárias*, 40(spe), 136-139.
- Carvalho, I. T. (2016) *Microbiologia básica*. Recife: EDUFRPE, 41-47.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. (2020). Publication M100-S23 Suggested Grouping of US-FDA Approved Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Non fastidious Organisms by Clinical Laboratories. Disponível em: URL: <https://clsi.org>
- Colombo, A. L., & Guimarães, T. (2003). Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36, 599-607.
- Coutinho, E. F., Ribeiro, F. C., & Cappellaro, T. H. (Ed.).(2009). Cultivo de Oliveira (*Olea europaea* L.) / Enilton Fick Coutinho, Fabrício Carlotto Ribeiro & Thaís Helena Cappellaro — Pelotas: Embrapa Clima Temperado. *Sistema de Produção*, 16(1), 125.
- Djipa, C. D., Delmée, M., & Quetin-Leclercq, J. (2000). Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (*Myrtaceae*). *Journal of Ethnopharmacology*, Limerick, 71(1-2), 307-313.
- Dogra, S., & Uprety, S. (2016). The menace of chronic and recurrent dermatophytosis in India: is the problem deeper than we perceive: Indian *Dermatology Online Journal*, 7(2), 73.
- Donadu, M. G., Peralta-Ruiz, Y., Usai, D., Maggio, F., Molina-Hernandez, J. B., Rizzo, D., & Chaves-Lopez, C. (2021). Óleo essencial colombiano de *Ruta graveolens* contra cepas de *Candida* resistentes a antifúngicos nosocomiais. *Revista dos Fungos*, 7(5), 383.
- Ebrahimi, M., Zarinfar, H., Naseri, A., Najafzadeh, M. J., Fata, A., Parian, M., Khorsand, I., & Babič, M. N. (2019). Epidemiology of dermatophytosis in northeastern Iran; A subtropical region. *Current Medical Mycology*, 5(2), 16.
- Eloff, J. N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Médica*, 64(08), 711-713.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (2012). *Embrapa discute a Olivicultura*. Disponível em: <http://www.cpact.embrapa.br/imprensa/noticias/2012/24102012.php>.
- Falkenberg, M. B., Santos, R. I., & Simões, C. M. (2002). Introdução à análise fitoquímica. In: Simões, C. M. O (org.). *Farmacognosia - da planta ao medicamento*. 4.ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS/UFSC, cap. 4, 63-72.
- Fennell, C. W., Lindsey, K. L., McGaw, L. J., Sparg, S. G., Stafford, G. I. Elgorashi, E. E., & Van Staden, J. (2004). Review: assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(2), 205-217.
- Feresin, G. E., Tapia, A., Lopez, S. N., & Zacchino, S. A. (2001). Antimicrobial activity of plants used in traditional medicine of San Juan province, Argentine. *Journal of Ethnopharmacology*, Limerick, 78(1), 103-107.
- Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, G., Rodríguez, R., Guillén, R., & Jiménez, A. (2006). Uso potencial de subprodutos de azeitona, Extração de compostos orgânicos interessantes de resíduos de azeite. *Grasas y Aceites*, 57(1), 95-106.
- Ghomari, O., Sounni, F., Massaoudi, Y., Ghanam, J., Drissi Kaitouni, L. B., Merzouki, M., & Benlemlih, M. (2019). Perfil fenólico (HPLC-UV) de folhas de oliveira de acordo com o procedimento de extração e avaliação da atividade antibacteriana. *Relatórios de Biotecnologia*, 23, e00347.
- Gremião, I. D. F., Martins da Silva da Rocha, E., Montenegro, H., Carneiro, A. J. B., Xavier, M. O., de Farias, M. R., & Lopes-Bezerra, L. M. (2021). Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(1), 107-124.

- Guinda, A. (2006). Aproveitamento de resíduo sólido da olivicultura. *Grasas Y Aceites*, 57(1), 107-115.
- Guinda, A., Pérez-Camino, M. C., & Lanzón, A. (2004). Supplementation of oil with oleonic acid from the olive leaf (*Olea europaea*). *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106(1), 22-26.
- IBRAOLIVA - Instituto Brasileiro de Olivicultura (2020). *Abertura oficial da colheita da oliva*. Disponível em: <https://www.ibraoliva.com.br>.
- IBRAOLIVA- Instituto Brasileiro de Olivicultura (2021). *Safra 2021 de oliveiras traz boas expectativas aos produtores*. Disponível em: <https://www.ibraoliva.com.br/noticias/detalhe/107/safra-2021-de-oliveiras-traz-boas-expectativas-aos-produtores>.
- Joshi, S., Shrestha, S., Timothy, U., Jha, A. K., & Thapa, D. P. (2020). Health seeking behavior and cost of care of chronic dermatophytosis: A hospital-based cross-sectional study. *Nepal Medical College Journal*, 22(3), 181-188.
- Khan, M. R., Kihara, M., & Omoloso, A. D. (2001). Antimicrobial activity of *Symplocos cochinchinensis*. *Fitoterapia (Milano)*, 72(7), 825-828.
- Kinnison, T., Guile, D., & May, S. A. (2015). Errors in veterinary practice: preliminary lessons for building better veterinary teams. *Veterinary Record*, 177(19), 492-492.
- 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.
- Kostelenos, G., & Kiritsakis, A. (2017). História e evolução da oliveira. *Azeitonas e azeite como alimentos funcionais: bioatividade, química e processamento*, 1-12.
- Le Tutour, B., & Guedon, D. (1992). Atividade antioxidante de folhas de *Olea europaea* e compostos fenólicos relacionados. *Phytochemistry*, 31(4), 1173-1178.
- Leme, M. I. S., Camargo, M., Furlani, A. C. F. A., Panizzi, R. C., Leite, R. F., & Rosa, J. (2007). Efeito *in vitro* de capim limão no desenvolvimento micelial de *Colletotrichum acutatum*. *Summa Phytopathologica*, 33(Suplemento).
- Liu, Y., McKeever, L. C., & Malik, N. S. (2017). Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato de folha de oliveira contra patógenos bacterianos de origem alimentar. *Fronteiras em microbiologia*, 8, 113.
- Locher, C. P., Burch, M. T., Mower, H. F., Berestecky, J., Davis, H., Van Poel, B., & Vlietinck, A. J. (1995). Atividade antimicrobiana e atividade anticoplimento de extratos obtidos de plantas medicinais havaianas selecionadas. *Journal of ethnopharmacology*, 49(1), 23-32.
- Maria do Socorro, M. R., Alves, R. E., Brito, E. S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., & Mancini-Filho, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 12(4), 996-1002.
- Mario, D. A. N., Santos, R. C. V., Denardi, L. B., de Almeida Vaucher, R., Santurio, J. M., & Alves, S. H. (2016). Interferência da melanina no perfil de suscetibilidade de espécies de *Sporothrix* à anfotericina B. *Revista Iberoamericana de Micología*, 33(1), 21-25.
- 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.
- Mello, L. D., & Pinheiro, M. F. (2012). Aspectos físico-químicos de azeite de oliva e de folhas de oliveira provenientes de cultivares do RS, Araraquara, Brasil. *Alimentos e Nutrição*, 23(4), 537-548.
- Menz, G., & Vriesekoop, F. (2010). Physical and chemical changes during the maturation of Gordal Sevillana olives (*Olea europaea* L., cv. Gordal Sevillana). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4934-4938.
- Nascimento, G. G., Locatelli, J., Freitas, P. C., & Silva, G. L. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, 31(2), 247-256.
- NCCLS, (2002). Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos; Norma Aprovada. NCCLS document M38-A (ISBN 1-56238-470-8).
- Nunan, E. D. A., Campos, L. M. M. D., Paiva, R. L. R., Oliveira, S. T. D., Dadoun, H. A., & Oliveira, A. B. D. (1985). Estudo da atividade antimicrobiana de extrato de folha de *Aristolochia gigantea* Mart. E Zucc. *Revista de Farmácia e Bioquímica*, Belo Horizonte, 6(1), 33-40.
- 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.
- Nweze, E. I., & Eke, I. E. (2018). Dermatophytes and dermatophytosis in the eastern and southern parts of Africa. *Medical Mycology*, 56(1), 13-28.
- Özcan, M. M., & Matthäus, B. (2017). Uma revisão: benefícios e propriedades bioativas das folhas de oliveira (*Olea europaea* L.). *Pesquisa e Tecnologia Alimentar Europeia*, 243(1), 89-99.
- Pacetta, C. F. (2013). *Estudo de diferentes metodologias para obtenção de extratos de folhas de oliveira (Olea europaea) contendo Oleuropeína*. 82f. Dissertação (Mestrado Ciências da Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.
- 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/UFMS*. Disponível em: https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf.
- Pereira, J. A., Pereira, A. P., Ferreira, I. C., Valentão, P., Andrade, P. B., Seabra, R., & Bento, A. (2006). Table olives from Portugal: phenolic compounds, antioxidant potential, and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(22), 8425-8431.
- Pereira, R. S., Dos Santos, H. D. H., Moraes, O.S., Júnior, D. P. L., & Hahn, R. C. (2020). Saúde pública infantil: perigo de exposição a fungos patogênicos em locais de lazer na região centro-oeste do Brasil. *Jornal de infecção e saúde pública*, 13(1), 51-57.
- Petridis, A., Therios, I., & Samouris, G. (2012). Variação genotípica da concentração de fenol total e oleuropeína e atividade antioxidante de 11 cultivares de azeitona grega (*Olea europaea* L.). *HortScience*, 47(3), 339-342.
- Pinto, T. J. A., Kaneko, T. M., & Ohara, M. T. (2003). *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos*: 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 325.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., & Oksman-Caldentey, K.-M. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *J. Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(4), 494- 507.
- Rafiei, Z., Jafari, S., Aalami, M., & Khomeiri, M. (2012). Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de folhas de oliveira pelo método ELISA. *Jornal iraniano de plantas medicinais e aromáticas*, 28, 280-292.
- Ramesh, N., Viswanathan, M. B., Saraswathy, A., Balakrishna, K., Brindha, P., & Lakshmanaperumalsamy, P. (2002). Estudos fitoquímicos e antimicrobianos de *Begonia malabarica*. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(1), 129-132.
- Ranalli, A., Contento, S., Lucera, L., Di Febo, M., Marchegiani, D., & Di Fonzo, V. (2006). Fatores que afetam o conteúdo de oleuropeína iridóide em folhas de oliveira (*Olea europaea* L.). *Jornal de química agrícola e alimentar*, 54(2), 434-440.
- Rengasamy, M., Shenoy, M. M., Dogra, S., Asokan, N., Khurana, A., Poojary, S., Jayaraman, J., Valia, A. R., Sardana, K., Kolalapudi, S., Marfatia, Y., Rao, P. N., Bhat, R. M., Kura, M., Pandhi, D., Barua, S., & Kaushal, V. (2020). Indian association of dermatologists, venereologists and leprologists (IADV) task force against recalcitrant tinea (ITART) consensus on the management of glabrous tinea (INTACT). *Indian Dermatology Online Journal*, 11(4), 502.
- Rodrigues, A. M., de Melo Teixeira, M., de Hoog, G. S., Schubach, T. M. P., Pereira, S. A., Fernandes, G. F., & de Camargo, Z. P. (2013). A análise filogenética revela uma alta prevalência de *Sporothrix brasiliensis* em surtos de esporotricose felina. *PLoS doenças tropicais negligenciadas*, 7(6), e2281.
- Roig, A., Cayuela, M. L. & Sánchez-Monedero, M. A. (2006) Uma visão geral sobre os resíduos do moinho de azeitona e seus métodos de valorização. *Waste Management*, 26(9), 960-969.
- Rossow, J. A., Queiroz-Telles, F., Cáceres, D. H., Cerveja, K. D., Jackson, B. R., Pereira, J. G., Ferreira Gremião, I. D., & Pereira, S. A. (2020). Uma abordagem One Health no combate ao *Sporothrix brasiliensis*: Revisão narrativa de um fungo patógeno zoonótico emergente na América do Sul. *Journal of Fungi*, 6(4), 247.
- Sanchotene, K. O., Brandolt, T. M., Klafke, G. B., Poester, V. R., & Xavier, M. O. (2017). *In vitro* susceptibility of *Sporothrix brasiliensis*: Comparison of yeast and mycelial phases. *Medical Mycology*, 55(8), 869-876.
- Silva, G. S. (2006). Substâncias naturais: uma alternativa para o controle de doenças. *Fitopatologia Brasileira*. Brasília, 31(9).
- Sudjana, A.N., D'Orazio, C., Ryan, V., Rasool, N., Ng, J., Islam, N., ... & Hammer, K. A. (2009). Atividade antimicrobiana do extrato comercial de folhas de *Olea europaea* (oliva). *Jornal internacional de agentes antimicrobianos*, 33(5), 461-463.
- Talapko, J., Juzbašić, M., Matijević, T., Pustijanac, E., Bekić, S., Kotris, I., & Škrlec, I. (2021). *Candida albicans* - os fatores de virulência e manifestações clínicas da infecção. *Journal of Fungi*, 7(2), 79.
- Talhaoui, N., Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A. M., Fernández-Gutierrez, A., & Segura-Carretero, A. (2015). Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International*, 77, 92-108.
- Teramoto, J. R. S., Bertocini, E. I., & Pantano, A. P. (2010). Histórico da introdução da cultura da oliveira no Brasil. *Infobios-Organização de Eventos Científicos, Cursos e Treinamentos*.
- Thielmann, J., Kohnen, S., & Hauser, C. (2017). Antimicrobial activity of *Olea europaea* Linné extracts and their applicability as natural food preservative agentes. *International Journal of Food Microbiology*, 251, 48-66.
- Vandeputte, P., Ferrari, S., & Coste, A. T. (2012). Resistência a antifúngicos e novas estratégias para controle de infecções fúngicas. *Revista Internacional de Microbiologia*, 1-26.
- Vásquez-del-Mercado, E., Arenas, R., & Padilla-Desgarenes, C. (2012). Journal: Clinics in Dermatology, 2012, № 4, p. 437-443. *Clinics in Dermatology*, (4), 437-443.
- Vogel, P., Kasper Machado, I., Garavaglia, J., Zani, V. T., De Souza, D., & Morelo, S. D. B. (2014). Benefícios dos polifenóis da folha de oliveira (*Olea europaea* L.) para a saúde humana. *Nutrição Hospitalaria*, 31(3), 1427-1433.
- Zapata, N., & Smaghe, G. (2010). Repellency and toxicity of essential oils from the leaves and bark of *Laurelia sempervirens* and *Drimys winteri* against *Tribolium castaneum*. *Industrial Crops and Products*, 32(3), 405-410.