

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO DE PLANTAS MEDICINAIS UTILIZADAS POR RIBEIRINHOS DO NORDESTE DE MATO GROSSO, BRASIL

Luciane Fontão de LIMA¹
João Vicente Braga de SOUZA²

¹Bolsista Iniciação Científica INPA-PAIC/FAPEAM;

²Orientador CSAS/INPA.

INTRODUÇÃO

Nos últimos tempos as infecções fúngicas têm aumentado consideravelmente e isso se deve a fatores como o envelhecimento populacional, o crescimento de pacientes imunocomprometidos, pacientes sob tratamento de graves doenças como câncer entre outros (Castro 2010). Um dos principais agentes etiológicos causadores dessas infecções são do gênero *Candida*. No ser humano essa levedura pode ser encontrada vivendo de maneira cosmopolita no trato gastrointestinal, cavidade bucal e órgãos genitais (Castro 2010).

Além disso, a resistência fúngica frente às drogas têm aumentado. Dentre esses mecanismos de resistências pode-se ressaltar a síntese aumentada de enzimas, implementação de vias metabólicas alternativas e a produção de bombas de efluxo na membrana que expulsam o medicamento (Scorzoni 2008).

Outro fator que contribui para o aumento dessas infecções é o número limitado de medicamentos disponíveis para o tratamento (Goldman *et al.* 2004). Temos hoje no mercado cinco classes de antifúngicos que são usados: polienos, fluoropirimidinas, azóis, equinocandinas e alilaminas. Esses possuem espectros de ação específicos e muitas vezes possuindo efeitos colaterais.

Desse modo, a pesquisa por novos agentes antifúngicos se faz uma questão além de importante, necessária. As plantas são um recurso que vêm sendo utilizado durante muitas décadas pela medicina popular apresentando resultados positivos, além de serem economicamente viáveis e de fácil obtenção (Castro 2010). Muitas delas já têm contribuído para a indústria farmacêutica através do isolamento de substâncias ativas e eficazes com considerável complexidade na composição química (Homma 2005).

A extensão territorial da Amazônia apresenta uma variedade de solos e com clima favorável ao desenvolvimento da biodiversidade de plantas e animais. Pesquisas envolvendo o uso de extratos de plantas como antifúngicos e antimicrobianos têm ganhado destaque devido ao número restrito de fármacos usados atualmente, e também ao crescente número de cepas resistentes (Sarto 2014).

Várias espécies de plantas nativas têm sido largamente empregadas pela população, cujo conhecimento acerca do uso medicinal foi desenvolvido inicialmente por comunidades indígenas e caboclas do país (Souza 2010). Entre as plantas medicinais mais utilizadas pela população poucas têm ação comprovada. Contudo, o uso popular tradicionalmente consolidado tem sido utilizado como guia para pesquisas farmacológicas (Bellmann 2007). Espécies pertencentes à família Lamiaceae (*Vitex triflora*), Combrataceae (*Terminalia argentea*), Lecythidaceae (*Bertholletia excelsa*), Bixaceae (*Cochlospermum orinocense*) e Simaroubaceae (*Simarouba versicolor*) são exemplos de plantas utilizadas como recurso terapêutico no combate de várias infecções (Junior *et al.* 2010). Os compostos ativos nesses extratos podem resultar em substâncias de interesse médico, bem como estruturas

químicas modelo para o desenvolvimento de novas drogas. Essas descobertas são de interesse das indústrias farmacêuticas, da classe médica e dos pacientes acometidos por micoses de difícil tratamento (Maciel 2002). Diante dessa situação, o objetivo do presente projeto é avaliar a concentração inibitória mínima e investigar a atividade antifúngica dos extratos de *Bertholletia excelsa*, *Cocholespermum orinocense*, *Simarouba versicolor*, *Terminalia argentea* e *Vitex triflora*.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de realização da pesquisa e cepa fúngica

Os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Micologia Médica no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. A cepa utilizada foi a *Candida albicans* ATCC 36232.

Extrato utilizado

No presente estudo foram utilizados os extratos hidroalcoólicos secos de *Bertholletia excelsa*, *Cocholespermum orinocense*, *Simarouba versicolor*, *Terminalia argentea* e *Vitex triflora*. Esses foram encaminhados pelo Prof. Dr. Domingos Tabajara de Oliveira Martins (UFMG) e Larissa Irene da Silva, dentro do convênio do projeto de pesquisa “Estudo etnobotânico, etnofarmacológico e fitoquímico de plantas medicinais utilizadas por ribeirinhos do Nordeste de Mato Grosso, Brasil”.

Avaliação da atividade antifúngica

Foram pesados 28,8 mg dos extratos citados, e esses foram diluídos em 100uL de Dimetilsulfoxido P.A. (DMSO) puro afim de aumentar sua solubilidade. Após essa etapa, foi adicionado 900uL de meio RPMI. Após 24 horas de crescimento da levedura *C. albicans* foi retirada uma alçada do inóculo e colocada em 5mL de solução salina estéril a 0,85%. Retirou-se dessa solução 10uL para leitura em câmara de Neubauer, onde foram considerados três campos para a contagem de células alcançando a concentração final de $2,5 \times 10^3$ células por mL.

Determinação da concentração inibitória mínima

O ensaio de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente à levedura do gênero *Candida* foi realizado utilizando a metodologia de diluição em microplaca, segundo a Norma M27-A2 de 2002 do CLSI. Foram usadas placas de microtitulação de 96 poços, com fundo plano, distribuídos em oito fileiras horizontais (A-H) e doze colunas verticais (1-12), ensaiando dez concentrações (200 µg/mL – 20 µg/mL dos extratos hidroetanólicos secos e 64 µg/mL cetoconazol). Foram adicionadas alíquotas de 100µL de meio líquido RPMI 1640 em todos os poços com uma pipeta multicanal. Em seguida foram adicionados aos poços na primeira coluna de A-H 100 µL da concentração mais alta dos extratos hidroetanólicos secos e da anfotecina B (28,800 µg/mL dos extratos hidroetanólicos secos e 64 µg/mL cetoconazol). Na sequência foram realizadas diluições sucessivas até a coluna dez da placa de microdiluição, desprezando-se os últimos 100 µL da solução de diluição. Em seguida, foram adicionados 100 µL de inóculo de *Candida albicans* já preparado ($2,5 \times 10^3$ células/mL) em cada poço, da primeira a décima primeira coluna. As outras duas colunas foram destinadas a controles internos de qualidade, sendo a coluna 11(onze) o controle no qual foi comprovado o crescimento de cada amostra do fungo e

a coluna 12 (doze) destinada ao controle de esterilidade do meio usado na reação. As placas foram tampadas e incubadas a 3 °C por 24 horas. Após esta etapa foi realizada a leitura macroscópica da placa sendo a CIM determinada como o poço com crescimento menor que 50% do crescimento do poço controle.

Avaliação dos mecanismos de ação - Efeito de proteção do Sorbitol

Esta metodologia foi desenvolvida da mesma forma que a determinação de CIM pela Norma M27-A2, com a adição de 0,8 M de sorbitol. Foi pesado 2,9142 g de sorbitol e diluído em 10 mL de RPMI afim de se obter a molaridade desejada. Foi preparado um inóculo com essa solução e um inóculo padrão sem sorbitol. Os testes foram feitos em duplicata. Após incubação a 37 °C, a CIM foi lida em 24 horas.

Ligação ao Ergosterol exógeno

Esta metodologia foi desenvolvida da mesma forma que a determinação de CIM pela Norma M27-A2, utilizando as concentrações de 400uL/mL, 800uL/mL, 1600uL/mL de ergosterol. Foi preparado 10mL do inóculo para cada concentração de ergosterol utilizada, e 10mL do inóculo sem ergosterol. Os testes foram feitos em duplicata para cada concentração. Após incubação a 37 °C, a CIM foi lida em 24 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente a concentração inibitória mínima dos extratos analisados apresentou os valores contidos na Tabela 1.

Tabela 1. Valores da concentração inibitória mínima dos extratos analisados.

Extratos	CIM
<i>Bertholletia excelsa</i>	450 µg/mL
<i>Cholospermum regium</i>	900 µg/mL
<i>Simarouba versicolor</i>	> 900 µg/mL
<i>Terminalia argentea</i>	450 µg/mL
<i>Vitex triflora</i>	900 µg/mL
Anfotericina B	≥ 1 µg/mL

O valor obtido a partir do extrato de *Terminalia argentea* apresentou-se relativamente alto quando comparado ao estudo de Assis (2013), que obteve a partir do extrato das folhas de *T. Argentea*, valor de CIM igual a 3,9 µg/mL para *C. albicans*. O extrato de *Bertholletia excelsa* obteve CIM igual a 0,45 mg/mL, demonstrando uma maior sensibilidade quando comparado aos valores obtidos a partir do óleo de castanha que variou de 0,98 a 125 mg/mL, segundo o trabalho de Mendes (2014). Gonçalves (2007) demonstrou que os extratos crus e frações da casca de *B. excelsa* também mostraram significante atividade in vitro frente às formas tripomastigota do *Trypanossoma cruzi*. Os resultados referentes à *Simarouba versicolor* não foram significantes quanto à inibição do crescimento da levedura. Esses resultados podem ser comparados aos obtidos por Violante (2008) e Albernaz (2006), onde os extratos e frações de *S. versicolor* e *G. ulmifolia*, apresentaram CIM maiores que 1000 µg/mL contra *C. albicans* e *C. tropicalis*, mas tiveram atividade contra *Cryptococcus sp.* A espécie *Cochlospermum regium* apresenta importantes propriedades terapêuticas relacionadas às infecções, principalmente aos do sistema reprodutivo feminino. A atividade antifúngica obtida nos resultados de Santos *et al.* (2012), mostrou resultados

significativos para espécies de *Candida* com CIM entre 250 e 500 µg/mL, o que pode ser comparado ao resultado obtido nesse estudo que foi igual a 450 µg/mL. Os estudos sobre a espécie *Vitex triflora* são escassos na literatura, porém foi relatado atividade antimicrobiana de plantas pertencentes à mesma família de *V. triflora* segundo os estudos de Santos *et al.* (2015) e Oliveira *et al.* (2006).

O sorbitol é um estabilizador osmótico da membrana celular, portanto, quando presente no meio dará suporte para o crescimento do fungo. Os extratos de *T. argentea*, *B. excelsa*, *C. orinocense*, quando testados na presença do sorbitol tiveram sua CIM aumentada em até oito vezes. Esses resultados sugerem que esses extratos atuam sobre a parede celular, pois foi necessária uma maior concentração dos mesmos para interferir na proteção osmótica na presença do sorbitol. Isso pode ser confirmado também no trabalho de Silva *et al.* (2010) e Pereira (2012), onde a CIM das substâncias estudadas apresentaram significativo aumento na presença do sorbitol, sugerindo a ação dessas substâncias sobre a parede celular fúngica.

Os fungos possuem como constituintes de membrana proteínas e lipídeos que funcionam como uma barreira impermeável, garantindo a integridade da célula. Os ensaios dos extratos de *T. argentea*, *B. excelsa*, *C. orinocense* sobre o ergosterol, um lipídeo de membrana, apresentaram aumento da CIM em até quatro vezes. Pereira *et al.* (2012) também observou aumento da CIM em quatro vezes na presença de ergosterol no teste com geraniol frente à *T. rubrum*. Esse resultado sugere a interação desses extratos com o ergosterol da membrana plasmática da levedura, pois na presença de ergosterol exógeno, será necessária uma maior concentração de produto no meio. Os extratos de *V. triflora* e *S. veriscolor* não apresentaram resultados relevantes quanto aos mecanismos de ação testados.

CONCLUSÃO

Os extratos obtidos a partir das plantas *Bertholletia excelsa*, *Cholospermum regium*, *Terminalia argentea* e *Vitex triflora*, apresentaram atividade antifúngica contra *Candida albicans* com concentração inibitória mínima entre 450 µg/mL e valor superior a 900 µg/mL. A CIM dos extratos de *B. excelsa* e *T. argentea* foram semelhantes e mostraram uma maior sensibilidade frente à levedura. A planta *Simarouba versicolor* apresentou uma CIM elevada em comparação aos outros extratos, portanto não inibiu o crescimento da levedura. Através dos ensaios de sorbitol e ergosterol pode-se observar que o espectro de ação desses extratos ocorre na membrana plasmática da célula fúngica. Mecanismos esses que interferem no equilíbrio osmótico e na integridade estrutural e funcional da membrana. Assim, é possível concluir sobre a atividade antifúngica que essas plantas possuem, reforçando a importância do estudo etnofarmacológico das espécies vegetais da Amazônia.

REFERÊNCIAS

- Albernaz, L.C. 2006. *Substância antimicrobiana de amplo espectro de Tabebuia caraiba*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília/Faculdade de Ciências da Saúde, Brasília, Distrito Federal. 91p.
- Assis, P.A. 2013. *Atividade antifúngica de extratos depositados no banco de extratos de plantas do bioma cerrado e de substâncias isoladas de Marayba guianensis*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília/Faculdade de Ciências da Saúde, Brasília, Distrito Federal. 168p.

- Bellmann, R. 2007. Clinical pharmacokinetics of systemically administered antimycotics. *Current Clinical Pharmacology*, 2: 37-58.
- Castro, R.D. de; Lima, E. de O. 2010. Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de. *Rev Odontol UNESP*, 39(3): 179–184.
- Goldman, G.H.; Da Silva, F.M.E.; Dos Reis, M.E.; Savoldi, M.; Perlin, D.; Park, S.; Godoy, M.P.C.; Goldman, M.H.; Colombo, A.L. 2004. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*, 50: 25-32.
- Homma, A.K.O. 2005. Amazônia: como aproveitar os benefícios da destruição? *Esdudos Avançados*, 19(19): 115–135.
- Junior, I.F.S. et al. 2010. Artigo Evaluation of the antifungal activity and mode of action of *Lafoensia pacari* A. St. -Hil., Lythraceae, stem-bark extracts, fractions and ellagic acid. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20: 422–428.
- Maciel, M.A.M.; Pinto, A.C.; Jr, V.F.V. 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quím. Nova*, 25(3): 429–438.
- Oliveira, R.A.G. de et al. 2006. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(1): 77–82.
- Pereira, F. de O. 2012. *Investigação do mecanismo da atividade antifúngica de monoterpenos frente a cepas de Trichophyton rubrum*. Tese de Doutorado, Universidade Federal da Paraíba/Centro de Ciências da Saúde, João Pessoa, Paraíba. 126p.
- Santos, K.T.J. et al. 2012. Abordagem Fitoquímica Preliminar e Avaliação da Atividade Antimicrobiana de *Cochlospermum regium* em Diferentes Metodologias (Bioautografia, Disco-Difusão e Microdiluição) Preliminary Phytochemical Approach and Antimicrobial Activity Assessment of Cochl. *Uniciências*, 16(1): 57–62.
- Sarto, M.P.M.; Junior, G.Z. 2014. Antimicrobial activity of essential oils. *Revista UNINGÁ Review*, 20: 98–102.
- Scorzoni, L. 2008. *Estudo da atividade antifúngica e perfil de expressão de proteínas em leveduras do gênero Candida após tratamento com extratos de Kielmeyera rubriflora*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas.
- Souza, N.A.B. 2010. *Possíveis mecanismos de atividade antifúngica de óleos essenciais contra fungos patogênicos*. Tese de Doutorado, Universidade Federal da Paraíba/Centro de Ciências da Saúde, João Pessoa, Paraíba. 149p.
- Violante, I.M.P. 2008. *Avaliação do potencial antimicrobiano e citotóxico de espécies vegetais do Cerrado da Região Centro-Oeste*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul. 64p.