

José Lucas Soares Ferreira

Universidade Federal de Campina Grande
(UFCG) jlucas_sf@hotmail.com

Joyce Natíelle Miranda Cavalcante

Universidade Federal de Campina Grande
(UFCG) joyce_natielle@hotmail.com

Daniele de Souza Siqueira

Universidade Federal de Campina Grande
(UFCG) danieleodonto13@gmail.com

Raquel Vieira Bezerra

Universidade Federal de Campina Grande
(UFCG) raquelvieir62@gmail.com

Letícia Ataíde Delgado

Universidade Federal de Campina Grande
(UFCG)
leticia.ataidedelgado@gmail.com

**Heloísa Mara Batista Fernandes de
Oliveira**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte
(UFRN)
heloisambf@gmail.com

Eric de Souza Soares Vieira

Universidade do Vale do São Francisco
(UNIVASF)

Gabriela Lemos de Azevedo Maia

Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
gabriela.lam@gmail.com

Edeltrudes de Oliveira Lima

Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
edelolima@yahoo.com.br

Abrahão Alves de Oliveira Filho

Professor Adjunto do Curso de Odontologia da
Universidade Federal de Campina Grande
(UFCG) abraham.farm@gmail.com

COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO AQUOSO E DO EXTRATO ETANÓLICO DE *RHAPHIODON ECHINUS* (LAMIACEAE) CONTRA CEPAS *CANDIDA TROPICALIS*

RESUMO

A microbiota residente da boca é bastante diversificada, com mais de 700 espécies de micro-organismos identificadas, das quais muitas ainda não foram descritas. Nessa vasta ecologia microbiana da cavidade bucal, encontram-se, pelo menos, vinte gêneros e, aproximadamente, noventa espécies de leveduras isoladas e classificadas. Os métodos convencionais para o tratamento de candidíase são baseados na utilização de agentes antifúngicos, porém, são observados vários inconvenientes quando da utilização dos mesmos, representados por toxicidade, interações antagônicas fármaco-fármaco, falta de eficácia fungicida, alto custo e surgimento de espécies resistentes, entre outras. Na busca por novas estratégias terapêuticas para a candidíase oral, estudos utilizando plantas medicinais estão sendo cada vez mais realizados. Essa pesquisa procura analisar a possível atividade antifúngica do extrato aquoso e etanólico de *Rhaphiodon echinus* (Lamiaceae) contra cepas de *Candida tropicalis*. Para a determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) do extrato, foi realizada a técnica da microdiluição em caldo. Utilizaram-se as seguintes cepas de *Candida tropicalis* (ATCC 13803, LM 14, LM 31 e LM 36). Foi realizado controle de viabilidade das cepas ensaiadas, e também controle de sensibilidade com o antimicrobiano Nistatina. As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a 35°C por 24 - 48 hs e se realizou a leitura. Diante dos resultados observou-se que CIM_{50%} do extrato aquoso e etanólico de *Rhaphiodon echinus* contra as cepas de *Candida tropicalis* foi de 512 µg/mL. Conclui-se que os extratos de *Rhaphiodon echinus* são eficazes contra as cepas de *C. tropicalis*.

Palavras-chave: *Rhaphiodon echinus*. *Candida tropicalis*. Plantas medicinais.

COMPARATION OF THE ANTIFUNGAL ACTIVITY OF THE AQUEOUS AND ETHANOLIC EXTRACTS OF *RHAPHIODON ECHINUS* (LAMIACEAE) AGAINST STRAINS *CANDIDA TROPICALIS*

ABSTRACT

The resident microbiota of the mouth is quite diverse, with more than 700 species of microorganisms identified, many of which have not yet been described. In this vast microbial ecology of the oral cavity, there are at least twenty genera and approximately

ninety species of isolated and classified yeasts. Conventional methods for the treatment of candidiasis are based on the use of antifungal agents, however, a number of drawbacks are observed when using them, represented by toxicity, antagonistic drug-drug interactions, lack of fungicidal efficacy, high cost and emergence of resistant species, among others. In the search for new therapeutic strategies for oral candidiasis, studies using medicinal plants are being increasingly performed. This research aims to analyze the possible antifungal activity of the aqueous and ethanolic extract of *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (Lamiaceae) against strains of *Candida tropicalis*. For the determination of MIC (Minimum Inhibitory Concentration) of the extract, the broth microdilution technique was performed. The following strains of *Candida tropicalis* (ATCC 13803, LM 14, LM 31 and LM 36) were used. Viability control of the strains tested, as well as sensitivity control with the antimicrobial Nystatin 100 IU / mL. The plates were aseptically closed and incubated at 35 ° C for 24-48 hours and read. In view of the results, it was observed that MIC 50% of the aqueous and ethanolic extract of *Rhaphiodon echinus* against the strains of *Candida tropicalis* was 512 µg / mL. It is concluded that the extracts of *Rhaphiodon echinus* are effective against the strains of *C. tropicalis*.

Keywords: *Rhaphiodon echinus*. *Candida tropicalis*. Medicinal plants.

Recebido em: 03/09/2018 - Aprovado em: 20/03/2019 - Disponibilizado em: 15/07/2019

1. INTRODUÇÃO

A candidíase constitui um espectro de infecções causadas por fungos do gênero *Candida*. O agente mais comum é a *Candida albicans*, mas outras espécies também têm sido identificadas, como, por exemplo, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. krusei*, entre outras (CRISSEY J, LANG H e PARISH LC, 1995).

Vários fatores são citados como responsáveis pela ocorrência das candidíases orais, alguns relacionados ao hospedeiro e outros à própria levedura. Os mais citados relacionados ao hospedeiro são: diabetes mellitus (DM), perda de dentes, restaurações, aparelhos (ortodônticos e protéticos), mudanças de hábitos alimentares, higiene oral, doenças sistêmicas, alterações

hormonais, certas drogas sistêmicas e locais, imunodepressão, radiação e quimioterapia (PAULA, 1998).

O aumento da resistência a antifúngicos alerta para a necessidade do desenvolvimento de estratégias que evitem a sua disseminação entre os fungos, como já ocorreu com as bactérias, que se encontra disseminada e fora de controle (CANUTO MM & RODERO FG, 2002).

As plantas medicinais são importantes por fornecerem matéria-prima para a síntese de drogas, além de serem utilizadas como agentes terapêuticos alternativos. O emprego das plantas é supervalorizado no uso tradicional com base nos seus benefícios medicinais. Dessa forma, torna-se imprescindível o conhecimento sobre a dose e a

parte empregada da planta, além de suas propriedades terapêuticas, pois existem aquelas que são altamente tóxicas, mesmo em pequenas doses (ZHAN & ZHOU, 2003).

Visando contribuir com este cenário atual, a química de produtos naturais de vegetais tem por objetivo avançar na identificação e elucidação estrutural de compostos com atividades biológicas, bem como na avaliação de propriedades conferidas a seus metabólitos (BRAZ FILHO, 2010).

A família Lamiaceae é composta por aproximadamente 240 gêneros e 7200 espécies, ocorrendo em todo o mundo desde regiões tropicais até áreas de clima temperado, com exceção da Antártida. No Brasil, são encontrados 32 gêneros e 496 espécies, sendo muitas destas espécies endêmicas do semiárido nordestino, com destaque para o gênero *Hyptis* e *Rhaphiodon* (HARLEY, 2012).

Em relação aos componentes químicos, a família Lamiaceae desperta grande interesse no estudo dos metabólitos secundários, como alcaloides flavonoides, terpenos, cumarinas, lignoides e os óleos essenciais (FERREIRA, 2009).

Óleos essenciais são produtos resultantes do metabolismo secundário das plantas, podendo ser extraídos por todos os órgãos, como brotos, folhas, flores, caules, galhos, raízes e sementes e são armazenados em células secretoras, epidérmicas e tricomas. Devido a sua rica composição química, dentre os principais são: terpenoides, alcaloides e cumarinas. Os óleos essenciais têm ganhado cada vez mais notoriedade e despertado interesse, dentre pesquisadores do mundo todo, devido as suas inúmeras

propriedades (RESCHKE; MARQUES e MAYWORM, 2007).

O presente trabalho objetiva, por meio de ensaios *in vitro*, comparar a Concentração Inibitória Mínima do extrato aquoso e do extrato etanólico de *Rhaphiodon echinus* (Lamiaceae) contra cepas de *Candida tropicalis*, para determinar a menor concentração do composto capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico.

2. METODOLOGIA

Ensaio *in vitro*

Substância-teste

Para os ensaios deste relatório parcial foram utilizados os extratos aquoso e etanólico das partes aéreas de *Rhaphiodon echinus*, que foram cedidos pela equipe da Prof^a. Dr^a. Gabriela Lemos de Azevedo Maia, da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF).

Os extratos foram conservados em frasco de vidro âmbar e mantidos sob-refrigeração. As emulsões dos extratos nas diferentes concentrações foram preparadas no momento de execução dos ensaios utilizando dimetilsulfóxido (DMSO), Tween 80 (INLAB/Indústria Brasileira) e quantidade suficiente para 3 mL de água destilada estéril.

O mesmo preparo foi realizado com o extrato etanólico em outro tubo de ensaio. E através de diluições em água destilada ou no próprio meio de cultura foram obtidas as concentrações desejadas de ambos os extratos.

Espécies Fúngicas

Foram utilizadas quatro cepas de *Candida tropicalis*, uma cepa padrão: ATCC 13803, e três cepas clínicas: LM 14, LM 31 e LM 36, previamente isoladas, identificadas e gentilmente cedidas pelo Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, sob a direção da Prof^a. Dr^a Edeltrudes de Oliveira Lima.

Todas as cepas foram mantidas em ágar Sabouraud dextrose (ASD) a uma temperatura de 4°C, sendo utilizados para os ensaios repiques de 24 horas em ASD incubados a 35 °C. No estudo da atividade antimicrobiana foi utilizado um inóculo fúngico de aproximadamente 10⁶ UFC/mL padronizado de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland.

Meios de cultura

Foi utilizado o meio ágar Sabouraud dextrose - ASD (Difco Lab., USA) para manutenção dos micro-organismos; preparados conforme as instruções do fabricante.

Fármaco antifúngico

Foi utilizado como antifúngico padrão (controle positivo), a nistatina em pó (Pharma Nostra, Rio de Janeiro). As soluções foram preparadas no momento de execução dos testes, para alcance das concentrações desejadas.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As Concentrações inibitórias mínimas dos extratos aquoso e etanólico de *Raphiodon echinus*

foram determinadas pela técnica de microdiluição em caldo (CLEELAND & SQUIRES, 1995).

Foram utilizadas placas de 96 orifícios estéreis e com tampa. Em cada orifício da placa, foi adicionado 100 µL do meio líquido caldo Sabouraud dextrose duplamente concentrado. Em seguida, 100 µL da emulsão do extrato na concentração inicial de 2048 µg/mL (também duplamente concentrado), foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa.

Por meio de uma diluição seriada em razão de dois, foram obtidas as concentrações de 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 e 4 µg/mL, de modo que na primeira linha da placa encontra-se a maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim, foram adicionados 10 µL do inóculo das espécies fúngicas nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica, especificamente.

Um controle de micro-organismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100 µL do mesmo CSD duplamente concentrado, 100 µL de água destilada estéril e 10 µL do inóculo de cada espécie. Para verificar a ausência de interferência nos resultados pelos solventes utilizados na preparação da emulsão, no caso o DMSO (dimetilsulfóxido) e o Tween 80, foi feito um controle no qual foram colocados nas cavidades 100 µL do caldo duplamente concentrado, o DMSO (5%), o Tween 80 (2%) e 10µL da suspensão fúngica. Um controle de esterilidade do meio também foi realizado, onde foi colocado 200 µL do CSD em um orifício sem a suspensão dos fungos.

As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a 35°C por 24 - 48 hs para ser

realizada a leitura. A CIM para os extratos e antifúngico foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico verificado nos orifícios quando comparado com o crescimento controle. Os experimentos foram realizados em duplicata.

3. RESULTADOS

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é referida como a menor concentração de uma

substância teste capaz de inibir o crescimento microbiano de maneira visível. Os dados obtidos estão presentes na tabela 1.

A CIM₅₀ é dita como a menor concentração capaz de inibir 50% das cepas durante o experimento; seguindo a premissa, observa-se que a CIM₅₀ para *Candida tropicalis* foi de 512 µg/mL

Tabela 1 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL do extrato aquoso de *Rhaphiodon echinus* contra cepas de *Candida tropicalis*.

Cepa Fúngica	CIM	Controle positivo	Controle negativo
ATCC 13803	1024 µg/MI	+	-
LM 14	1024 µg/mL	+	-
LM 31	256 µg/mL	+	-
LM 36	512 µg/mL	+	-

(-) = não houve inibição visível da cepa (+) = inibição visível da cepa **Fonte:** Autoria própria

A menor CIM do extrato aquoso de *Rhaphiodon echinus* (Lamiaceae) foi de 256 µg/mL, para a cepa LM 31. A cepa LM 36 obteve CIM igual 512 µg/mL, enquanto as cepas ATCC 13803 e LM 14 apresentaram padrão igual de resposta frente ao composto testado (1024 µg/mL) (Tabela 1).

A menor CIM do extrato etanólico de *Rhaphiodon echinus* (Lamiaceae) foi de 256 µg/mL, para a cepa LM 31. A cepa LM 36 e LM 14 obtiveram CIM igual 512 µg/mL, enquanto a cepa ATCC 13803 apresentou valor de CIM igual à 1024 µg/mL (Tabela 2).

Tabela 2 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL do extrato etanólico de *Rhaphiodon echinus* contra cepas de *Candida tropicalis*.

Cepa Fúngica	CIM	Controle positivo	Controle negativo
ATCC 13803	1024 µg/MI	+	-
LM 14	512 µg/mL	+	-

LM 31	256 µg/mL	+	-
LM 36	512 µg/mL	+	-

(-) = não houve inibição visível da cepa (+) = inibição visível da cepa **Fonte:** Autoria própria

4. DISCUSSÃO

Segundo Sartoratto (2004), o potencial antifúngico é dito forte quando a CIM atinge valores inferiores a 500 µg/mL, moderado entre 600 µg/mL – 1500 µg/mL e considerado fraco quando os valores da CIM ultrapassarem 1500 µg/mL.

Os extratos aquoso e etanólico de *Rhaphiodon echinus* demonstraram forte atividade antifúngica sobre as cepas de *Candida tropicalis* visto que obtiveram CIM50 igual a 512 µg/mL.

Pesquisas de Córdova et al. (2016) revelaram susceptibilidade de cepas de *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. faecalis* e *C. albicans* para o extrato hexânico de outra espécie vegetal pertencente à família *Lamiaceae*, a *S. apiana*. E pela primeira vez, a atividade antibacteriana e antifúngica *in vitro* desse monoterpeneo é relatada contra patógenos de relevância clínica.

Asdadi et al. (2015) verificaram as propriedades antifúngica e antioxidante a dos extrato de *Vitex agnus castus* (espécie vegetal pertencente à família *Lamiaceae*) contra cepas de *Candida*, utilizando os métodos de microdiluição em caldo e DPPH. Os resultados deste estudo mostraram que estes óleos exibem atividade antifúngica significativa contra fungos selecionados.

Duarte et al. (2016) testaram as propriedades moduladoras do óleo essencial de *R. echinus* quando associado a antimicrobianos, contra cepas fúngicas de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tro-*

picalis e cepas bacterianas de *E. coli*, *S. aureus* e *Pseudomonas*. No estudo foi observada uma baixa atividade antifúngica e antibacteriana do óleo essencial, mas um forte efeito modulador quando associado aos antimicrobianos. Segundo os pesquisadores, o óleo essencial também apresenta uma forte atividade quelante de ferro.

Costa et al. (2017) verificaram o potencial antifúngico dos extratos de *R. echinus* contra cepas de diferentes espécies de *Candida* e observaram o efeito modulador destes extratos quando associados a antifúngicos sintéticos.

Pio et al (2018) realizou um levantamento sobre os conhecimentos e usos de plantas medicinais dos habitantes das ilhas do rio São Francisco. *R. echinus* apresentou-se como a planta, cujos efeitos e propriedades, eram mais conhecidos e usados corretamente pela população. No mesmo estudo foram avaliados os efeitos antimicrobianos dos extratos aquoso e etanólico de *R. echinus* por meio da técnica de microdiluição, contra cepas bacterianas. Foi possível observar que o extrato aquoso não apresentou efeito desejável sobre as cepas bacterianas, entretanto o extrato etanólico de *R. echinus* apresentou efeito moderado. A fração acetato de etila do extrato etanólico, apresentou forte potencial antibacteriano sobre as cepas estudadas.

5. CONCLUSÃO

Portanto, com base nos resultados obtidos pode-se perceber que o do extrato aquoso e etanólico de *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (Lamiaceae) apresenta um forte efeito antifúngico contra cepas de *C. tropicalis*. Desta forma, sugere-se que este composto pode ser utilizado como uma alternativa terapêutica para o combate de infecções causadas por esse fungo.

6. AGRADECIMENTOS

Agradeço À Universidade Federal de Campina Grande pelo apoio.

REFERÊNCIAS

- ASDADI, A. et al. Study on chemical analysis, antioxidant and in vitro antifungal activities of essential oil from wild Vitex agnus-castus L. seeds growing in area of Argan Tree of Morocco against clinical strains of Candida responsible for nosocomial infections. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 25, n. 4, p. e118-e127, 2015.
- BRAZ FILHO, Raimundo. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.
- CANUTO, Mar Masiá; RODERO, Félix Gutiérrez. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 9, p. 550-563, 2002.
- CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections. In: Lorian, V. M. D. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. New York: Willians & Wilkins, p. 739-788, 1991.
- CÓRDOVA-GUERRERO, I. et al. Actividad antibacteriana y antifúngica de un extracto de Salvia apiana frente a microorganismos de importancia clínica. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 48, n. 3, p. 217-221, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754116300487>>. Acesso em: 31 ago. 2018.
- COSTA, A. R.; DE LIMA SILVA, J.; LIMA, K. R. R. et al. *Rhaphiodon echinus* (Nees & Mart. Schauer: Chemical, toxicological activity and increased antibiotic activity of antifungal drug activity and antibacterial. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p. 280-286, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401016306878?via%3Dihub>>. Acesso em: 31 ago. 2018.
- CRISSEY, J. T.; LANG, H.; LAWRENCE C. **Manual of medical mycology**. Cambridge, Mass., USA: Blackwell Scientific, 1995.
- DUARTE, A. et al. Antimicrobial Activity and Modulatory Effect of Essential Oil from the Leaf of *Rhaphiodon echinus* (Nees & Mart) Schauer on Some Antimicrobial Drugs. **Molecules**, v. 21, n. 6, p. 743, 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/21/6/743>>.
- FERREIRA, H. D. Morphology, taxonomy, phylogeny, leaf anatomy and fitoquímica species of the genus Hyptis Jacq. (Labiatae) occurring in Goiás and Tocantins. 2010. 483 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.
- HARLEY, R M. Checklist and key of genera and species of the Lamiaceae of the Brazilian Amazon. **Rodriguésia**, v. 63, n. 1, p. 129-144, 2012.
- PAULA, C. R. Candidíases. **Compêndio de micologia médica**. Rio de Janeiro: Medsi, p. 99-107, 1998.
- PIO, I. D. S. L. et al. Traditional knowledge and uses of medicinal plants by the inhabitants of the islands of the São Francisco river, Brazil and preliminary analysis of *Rhaphiodon echinus* (Lamiaceae). **Braz. J. Biol.**, São Carlos, 2018. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842018005011102&lng=en&nrm=iso>. access on 30 Aug. 2018. Epub Apr 19, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.177447>.
- RESCHKE, A.; MARQUES, L. M.; MAYWORM, M. A. S. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (Moraceae). **Rev. Bras. Plant Med**, v. 9, p. 67-70, 2007.
- SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.
- ZHAN, Jinbiao; ZHOU, Peiheng. A simplified method to evaluate the acute toxicity of ricin and

ricinus agglutinin. **Toxicology**, v. 186, n. 1-2, p. 119-123, 2003.

José Lucas Soares Ferreira

Acadêmico do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

Joyce Natíelle Miranda Cavalcante

Acadêmica do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

Daniele de Souza Siqueira

Acadêmica do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

Raquel Vieira Bezerra

Acadêmica do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

Letícia Ataíde Delgado

Cirurgiã-Dentista pela Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

Heloísa Mara Batista Fernandes de Oliveira

Mestra em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Eric de Souza Soares Vieira

Mestrando em Ciências da Saúde pela Universidade do Vale do São Francisco (UNIVASF)

Gabriela Lemos de Azevedo Maia

Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Edeltrudes de Oliveira Lima

Doutora em Farmácia pela Universidade Federal de São Paulo (USP)

Abrahão Alves de Oliveira Filho

Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
Professor Adjunto do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)
