

Atividade antifúngica da fase clorofórmica de *Raphiodon echinus* contra *Candida albicans*

Antifungal activity of the chloroformic phase of *Raphiodon echinus* against *Candida albicans*

Maelle Santos Araújo¹, Maria Alice Araújo de Medeiros¹, Millena de Souza Alves¹, Bernadete Santos¹, Luciano de Brito Junior¹, Aline de Farias Diniz¹, Maria das Graças Veloso Marinho de Almeida¹, Veneziano Guedes de Sousa Rêgo¹, Raline Mendonça dos Anjos¹, Aleson Pereira de Sousa², Edeltrudes de Oliveira Lima², Gabriela Lemos de Azevedo Maia³, Abrahão Alves de Oliveira Filho^{1*}

RESUMO

Candidíase é uma micose causada por leveduras do gênero *Candida*. Essas infecções envolvem uma diversidade ampla de doenças superficiais e invasivas, acometendo pacientes principalmente imunologicamente comprometidos que estão expostos a uma grande variedade de fatores de risco. *Candida albicans* é a espécie mais repetidamente isolada de infecções superficiais e invasivas em diversos ambientes anatômicos. Tem sido ressaltado, com maior assiduidade, o isolamento de cepas de leveduras com sensibilidade diminuída ou resistentes aos antifúngicos. Assim, torna-se fundamental a realização de novos estudos sobre alternativas terapêuticas. Os fitoterápicos podem representar uma destas alternativas. Neste contexto, este trabalho teve por objetivo determinar a concentração inibitória mínima da fase clorofórmica de *Raphiodon echinus* sobre cepas de *Candida albicans* utilizando o método de determinação da concentração inibitória Mínima (CIM) sobre a técnica de microdiluição em caldo, onde apresentou CIM50 de 256 µg/mL para as cepas do fungo. Dessa forma, pode-se observar que o produto natural testado apresentou um forte efeito antifúngico frente às cepas de *Candida albicans*.

Palavras-chave: Micose; Fitoterápico; *Candida albicans*.

ABSTRACT

Candidiasis is a mycosis caused by yeasts of the genus *Candida*. These infections involve a wide range of superficial and invasive diseases, affecting mainly immunologically compromised patients who are exposed to a wide variety of risk factors. *Candida albicans* is the species most repeatedly isolated from superficial and invasive infections in a variety of anatomical settings. The isolation of yeast strains with decreased sensitivity or resistance to antifungal drugs has been highlighted more assiduously. Thus, it is essential to carry out new studies on therapeutic alternatives. The herbal medicines can represent one of these alternatives. In this context, this work aimed to determine the minimal inhibitory concentration of the chloroform phase of *Raphiodon echinus* on strains of *Candida albicans* using the method for determining the minimal inhibitory concentration (MIC) on the broth microdilution technique, which showed MIC50 of 256 µg/mL for strains of the fungus. Thus, it can be observed that the tested natural product showed a strong antifungal effect against *Candida albicans* strains.

Keywords: Mycosis; Phytotherapeutic; *Candida albicans*.

¹ Universidade Federal de Campina Grande.

* Abrahao.alves@professor.ufcg.edu.br

² Universidade Federal da Paraíba.

³ Universidade Federal do Vale do São Francisco.

INTRODUÇÃO

Candidíase é uma micose causada por leveduras do gênero *Candida*, em que o detrimento pode ser brando agudo ou crônico, superficial ou profundo, e de espectro clínico bem declinável (FREIRE et al., 2016).

As leveduras do gênero *Candida* exibem grande importância pela abrangente constância com que colonizam e infectam o hospedeiro humano. Essas infecções envolvem uma diversidade ampla de doenças superficiais e invasivas, acometendo pacientes principalmente imunologicamente comprometidos que estão expostos a uma grande variedade de fatores de risco (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Estas micoses podem ser ocasionadas por distintas espécies. *Candida albicans* continua sendo a espécie mais prevalente, mas espécies como *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*, tem adquirido importância crescente (RÖRIG; COLACITE; ABEGG, 2009).

Candida albicans é a espécie mais repetidamente isolada de infecções superficiais e invasivas em diversos ambientes anatômicos. Comumente se avalia que a origem de *C. albicans* seja a microbiota do trato digestório humano e como causa de candidíase em todas as partes do mundo. É a espécie com máxima informação patogênica, devido à distinção de fatores de virulência descobertos (FREIRE et al., 2016).

Tem sido ressaltado, com maior assiduidade, o isolamento de cepas de leveduras com sensibilidade diminuída ou resistentes aos antifúngicos. A resistência aos antifúngicos, clínica ou in vitro, pode dar-se quando células de fungos suscetíveis passam a serem resistentes devido à relação antecedente com a droga ou é inerente ao próprio microrganismo (ZARDO; MEZZARI, 2004).

Assim, torna-se fundamental a realização de novos estudos sobre alternativas terapêuticas que sejam simultaneamente antifúngicas, anti-inflamatórias, não tóxicas para os tecidos e que produzam menos danos ao corpo que os métodos convencionais. Os fitoterápicos podem representar uma destas alternativas (ALAVARCE, 2014).

A família Lamiaceae é composta por aproximadamente 240 gêneros e 7200 espécies. No Brasil, são encontrados 32 gêneros e 496 espécies, sendo muitas destas endêmicas do semiárido nordestino. Podemos ressaltar o gênero *Rhaphiodon*,

monotípico, formado por uma única espécie, a *Rhaphiodon echinus*, apreciada como característica dessa região (PEREIRA et al., 2015).

Diante da importância dos extratos das plantas para o tratamento de infecções, o presente estudo teve como objetivo determinar a concentração inibitória mínima da fase clorofórmica de *Rhaphiodon echinus* sobre cepas de *Candida albicans*.

MATERIAS E MÉTODOS

A fase clorofórmica de *Rhaphiodon echinus* foi cedida pela equipe da professora Dr. Gabriela Lemos de Azevedo Maia - Univasf. Para atingir os testes farmacológicos, a substância foi solubilizada em DMSO e diluída em água destilada. A concentração de DMSO foi inferior a 0,1% v/v.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A atividade antifúngica foi realizada em cinco cepas selecionadas de *Candida albicans* ATCC 76645, LM 106, LM 108, LM 111. Todas as cepas de microrganismos utilizadas neste estudo fazem parte da MICOTECA do Laboratório de Micologia/DFP/CCS/UFPB.

A atividade antifúngica foi realizada de acordo com os protocolos descritos por Cleeland e Squires (1991), Hadacek e Greger (2000) e CSLI (2008).

As CIMs do *Rhaphiodon echinus* foram determinadas contra cepas de *Candida albicans* pela técnica de microdiluição em caldo. Inicialmente, 100 µL de caldo de dextrose Sabouraud foram adicionados aos poços da placa de microdiluição. Em seguida, 100 µL dos produtos da emulsão foram dispensados nos poços da primeira fila. Uma razão de duas concentrações foram obtidas de 1024 µg/mL a 2 µg/mL, de modo que a primeira linha da placa encontrasse a maior concentração e, por último, a menor concentração. Finalmente, 10 µL do inóculo foram adicionados às cavidades, onde cada coluna de placa se referiu a uma cepa fúngica, em particular.

Paralelamente, foi realizado o controle de viabilidade das cepas testadas, juntamente com o controle de sensibilidade, essas cepas de ação antifúngica consideradas padrões em uso clínico (Nistatina 100 UI / mL). Para verificar a ausência de interferência do solvente nos resultados, um controle foi colocado nas cavidades 100µL do caldo duplamente concentrado, 100µL de *Rhaphiodon echinus* e 10µL da suspensão foi feita.

As placas foram seladas assepticamente e incubadas a 35°C durante 24 - 48 horas. O teste foi realizado em duplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CIMs obtidas nos dois testes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a resistência antimicrobiana considerada como um problema essencial à terapia é preciso à procura de novas formas terapêuticas que sejam mais competentes para o tratamento de infecções, como os fungos. Utilizar produtos naturais com atividade antimicrobiana é uma alternativa extremamente viável, uma vez que sempre foram importantes para o descobrimento de novas drogas (XU; LEE, 2001).

Os resultados da CIM (Concentração Inibitória Mínima) de *Raphiodon echinus* contra as cepas de *Candida albicans* são mostrados na Tabela 1. Para o teste de microdiluição em caldo, a fase clorofórmica de *Raphiodon echinus* apresentou CIM50 de 256 µg/mL, para as cepas fúngicas ATCC 76645 e LM 106.

Tabela 1 - Atividade antifúngica para determinação da CIM da fase clorofórmica do *Raphiodon echinus* contra cepas de *Candida albicans*.

Substância/cepa	ATCC 76645	LM 106	LM 108	LM 111
1024 µg/mL	+	+	+	+
512 µg/mL	-	+	+	+
256 µg/mL	-	-	+	+
128 µg/mL	-	-	-	-
64 µg/mL	-	-	-	-
32 µg/mL	-	-	-	-
16 µg/mL	-	-	-	-
Controle Positivo	+	+	+	+
Controle Negativo	-	-	-	-

(-) Nenhuma inibição (+) Inibição

Fonte: Autoria própria (2022)

Sartoratto et al., (2004) sugerem que uma atividade antimicrobiana é classificada como forte quando possuem CIM de até 500 µg/mL, moderada para CIM de 600 a 1500 µg/mL e fraca para CIM acima de 1500 µg/mL. Sendo assim, de acordo com os resultados da fase clorofórmica de *Raphiodon echinus*, a mesma pode ser considerada forte inibidora frente às cepas *Candida albicans*.

Outras espécies da família Lameaceae também mostraram atividade antifúngica, como *Thymus vulgaris* sobre o crescimento de *Aspergillus flavus*. O extrato alcoólico de

Thymus vulgaris a uma concentração de 48% na dose de 2500 ppm no soro composição de revestimento em kernel estéril, impediu totalmente o crescimento de *Aspergillus flavus* em nozes (DEGHAN; SHARIFZADEH; JAVANENIKKHAH, 2013). Existem dezoito espécies da família Lamiaceae utilizadas em problemas respiratórios na região Sudeste, pertencentes a dez gêneros. Dentre essas espécies, onze ainda necessitam de estudos científicos que comprovem sua ação antimicrobiana, sendo a maioria de origem brasileira (SILVA; MOURA, 2011). Islam et al., (2005) estudaram os efeitos analgésicos e anti-inflamatórios do extrato metanólico da espécie *Leonorus sibiricus* L através de testes in vivo. Ambos os resultados foram significativos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio da análise dos resultados, pode-se observar a considerável atividade antifúngica da fase clorofórmica de *Raphiodon echinus* frente às cepas da espécie *Candida albicans* em relação às cepas de origem clínica. Dessa forma, pode-se destacar a possível utilização desta substância para futuros tratamentos das doenças causadas pelas leveduras de *Candida albicans*, destacando assim a necessidade de mais estudos para detalhar esta atividade farmacológica.

REFERÊNCIAS

ALAVARCE, R. A. S. **Fitoterápico Equisetum giganteum e estomatite protética: estudo da ação antimicrobiana, antiaderente e anti-inflamatória contra Candida albicans, e potencial citotóxico sobre células epiteliais do palato humano.** 2014. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo.

CLEELAND R, SQUIRES E. **Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections.** In: Lorian, V. *Antibiotic Lab Med.* New York: Williams & Wilkins, Baltimore. n. 3,p. 739-788, 1991.

CLSI. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts.** CLSI document M27-A3, v.28, n.14, 2008.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 599-607, 2003.

DEGHAN M, SHARIFZADEH F, JAVANENIKKHAH M. Rye seeds of radish and *Aspergillus*. **Science and Technology Seed Iran**, v.1, n.1, p. 28-37, 2013.

FREIRE, J. C. P. et al. Atividade antifúngica de fitoterápicos sobre espécies de *Candida*: uma revisão de literatura. **Archives Of Health Investigation**, v. 5, n. 6, 2016.

HADACEK F, GREGER H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytoch Anal**, 11, p.137-147, 2000.

ISLAM, M.A. et al. Analgesic and anti-inflammatory activity of Leonurus sibiricus. **Fitoterapia**, v. 76, n. 3-4, p. 359-362, 2005.

PEREIRA, L. C. O. et al. Caracterização química de óleos essenciais de quatro espécies da família Lamiaceae: Hyptis suaveolens (L.) Poit, Hyptis pectinata (L.) Poit, Hyptis martiusii Benth. e Rhabiodon echinus (Nees & Mart.) Schauer. 2015.

RÖRIG, K.C.O.; COLACITE, J.; ABEGG, M.A. Produção de fatores de virulência in vitro por espécies patogênicas do gênero Candida. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 225-227, 2009.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Braz J Microbiol**, v.35, p.275-280, 2004.

SILVA, I.; MOURA, R. Lamiaceae and Asteraceae Species Used in Southeast Brazil by Folk Medicine for Respiratory Diseases: What do the Scientific Evidences Say. **Revista Fitos**, v. 6, n. 01, p. 21-28, 2011.

XU, Hong-Xi; LEE, Song F. Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 15, n. 1, p. 39-43, 2001.

ZARDO, V.; MEZZARI, A. Os antifúngicos nas infecções por Candida sp. **NewsLab**, v. 63, p. 136-46, 2004.

Recebido em: 05/08/2022

Aprovado em: 10/08/2022

Publicado em: 16/08/2022