

O USO DE HORTALIÇAS NÃO-CONVENCIONAIS NA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA EM CEPA DE CANDIDA RESISTENTE ATCC 90028.

Francisco Glauber Peixoto Ferreira ¹, Ana Caroline Rocha de Melo Leite ², Erika Helena de Sales Brito ³, Juliana Jales de Hollanda Celestino ⁴

RESUMO

A candidíase caracteriza-se como uma síndrome clínica que tem como agente causador o fungo do gênero *Candida*, em especial cita-se a espécie *Candida albicans* ATCC90028, trata-se de uma cepa padronizada em laboratório e tem como característica a produção de biofilme, e também determinada resistência a triazólicos, como é o caso do fluconazol. Nesse contexto, plantas medicinais vêm sendo testadas para o combate de diferentes patologias, como por exemplo, para a candidíase, podendo destacar então a espécie *Pereskia aculeata* Miller com diferentes efeitos terapêuticos. Com isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar se o extrato hidroalcoólico das folhas de *Pereskia aculeata* Miller promove efeito antifúngico no combate ao gênero *Candida*, no que se refere à espécie *C. albicans* ATCC 90028. Quanto ao método, tratou-se de um estudo descritivo, transversal e analítico com abordagem quantitativa. A planta *Pereskia aculeata* Miller foi coletada no sítio da Biodiversidade localizado no Maciço de Baturité, na cidade de Mulungu-CE. Os extratos das folhas de *P. aculeata* Miller foram preparados com álcool 70% e água destilada. Utilizou-se o teste de atividade antifúngica pelo método microdiluição em caldo. Os dados obtidos foram tabulados em Planilha Microsoft Office Excel 2013® para análise estatística e plotados para o Programas estatístico Statistical Package for the Social Sciences - SPSS versão 20.0 para geração de gráficos e tabelas. Os valores obtidos foram expressos $\pm$ erro padrão médio (E.P.M), com índice de significância de 0,05. No decorrer dos resultados, verificou-se que o extrato hidroalcoólico de *P. aculeata* produziu atividade de inibição atividade fúngica na cepa em questão, sendo equivalente nas concentrações de 12,5% por meio do método de diluição seriada. Dessa forma, o estudo comprovou através da técnica de microdiluição em caldo que há inibição de crescimento na *Candida* ATCC90028 utilizando o extrato de *P. aculeata*.

Palavras-chave:

Pereskia aculeata Miller. Atividade antifúngica. *Candida* ssp.

¹ UNILAB, Mestrado Acadêmico em Sociobiodiversidade e Tecnologia Sustentável (MASTS), Discente, e-mail: fgpf.glauber@hotmail.com

² UNILAB, Instituto das Ciências da Saúde, Docente, e-mail: acarolmelo@unilab.edu.br

³ UNILAB, Instituto das Ciências da Saúde, Docente, e-mail: erika@unilab.edu.br

⁴ UNILAB, Instituto das Ciências da Saúde, Docente, e-mail: juliana.celestino@unilab.edu.br

INTRODUÇÃO

A candidíase pode ser definida como uma patologia oportunista tendo como causa as leveduras do gênero *Candida*, principalmente as espécies *Candida albicans*, *Candida não-albicans*, como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*; e recentemente analisada a *C. dubliniensis* (AVRELLA & GOULART, 2008).

Com relação a *Candida albicans* ATCC90028, esta se trata de uma espécie padronizada em laboratório e tem como característica a produção de biofilme, outro fator é a resistência a triazólicos, como é o caso do fluconazol (TURAN & DEMIRBILEK, 2018). Com isso, sendo pertinente a mais um motivo de utiliza-la para estudos utilizando extratos naturais. Diante de tais fatos, a ciência busca cada vez mais alternativas farmacológicas no intuito de minimizar esses dados, e uma das opções são os produtos de origem natural, como é o caso das plantas medicinais.

As plantas medicinais podem constituir uma alternativa eficaz para o tratamento de distintas infecções, sendo cada vez maior o número de pessoas a recorrerem ao seu uso como complemento da medicação habitual (GARCIA & SOLIS, 2007; MARTINS, 2010). Essa prática envolve uma série de fatores tais como a falta de acessibilidade no Sistema de Saúde, que por sua vez torna-se o único recurso no combate às patologias em determinadas comunidades (LEITE et al., 2008; ALBUQUERQUE et al., 2010; ROQUE et al., 2010). Outro ponto em questão é o custo-benefício, e quando se trata do Brasil, por possuir um clima tropical e propício ao cultivo de espécie específica, o consumo desses manipulados tende a ser ainda maior e com frequência contínua (PISANO et al., 2014).

Dentre essas plantas podemos destacar a do gênero *Pereskia aculeata* Miller, conhecida popularmente como ora-pró-nobis. É uma planta de estrutura trepadeira arbustiva da família *Cactaceae* sendo muito utilizada para ornamentação, produto alimentício e, principalmente, com finalidade medicinal. Santos et al., (2010) fez uso da espécie em seus estudos com o objetivo de obter uma substância contra processo inflamatório e recuperação de tecido tegumentar nos acidentes por queimadura.

Outros efeitos terapêuticos são: tratamento de doenças incluindo diabetes e hipertensão arterial sistêmica (HAS), efeitos antitumoral, antirreumático, anti-ulceroso e anti-inflamatório, analgésico para cefaleia e dores gástricas, hemorroidas e dermatite atópica (GOH, 2010). Outra espécie do gênero *Pereskia*, a *P. bleo*, tem sido amplamente estudada devido às suas propriedades antiproliferativas e anticancerígenas (ABDUL-WAHAB et al. 2009).

Diante do exposto essa pesquisa objetivou avaliar se o extrato hidroalcoólico das folhas de *Pereskia aculeata* Miller promove efeito antifúngico no crescimento da espécie *Candida albicans* ATCC 90028 por meio da técnica de microdiluição em caldo.

METODOLOGIA

Tratou-se de um estudo descritivo, transversal e analítico com abordagem quantitativa. Amostra da planta *Pereskia aculeata* Miller foi coletada no Sítio Vale da Biodiversidade situada no Maciço de Baturité, na cidade de Mulungu-Ce. A localização é representada pelas seguintes coordenadas: Longitude: 038°.31'.3928", Latitude: 03°.44'.9775" e Altura: 14.587.

As folhas de *Pereskia aculeata* Miller foram coletadas e armazenadas em recipiente com tampa fechada em temperatura ambiente a 34 °C. Não foi acrescentado nenhum tipo de conservante ou substância que possa atrapalhar no processamento de extração. As folhas de *P. aculeata* foram encaminhadas para o laboratório de Fisiologia Vegetal, Campus das Auroras da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - UNILAB, e acondicionada em sala fria com temperatura média de -90 C°.

O extrato das folhas de *P. aculeata* foi obtido segundo metodologia usada por Kim et al. (2013) com adaptações. A preparação ocorreu com álcool 70% e água destilada. O etanol 70% foi adicionado no béquer contendo folhas da planta masseradas na proporção de 1:20 (m/v), e a mistura permaneceu sob agitação (Solab, modelo SL-152/10) por 8 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, o filtrado obtido foi concentrado em rotoevaporador para eliminação do álcool, completado o volume com água destilada. Após, essa mistura foi filtrada em papel de filtro Whatman nº 1 num quantitativo de três vezes.

As concentrações do extrato foram determinadas conforme o método descrito por Park et al. (1995) com modificações. O extrato hidroalcoólico das folhas de *P. aculeata* foi diluído em método seriado de RPMI ao

qual na primeira fileira de poços da placa de micro cultivo fundo U continha 100% ou seja 100 µL do extrato, na 2 fileira essa concentração caiu pela metade (50µL), e assim sucessivamente no decorrer de 12 poços da placa de microdiluição. O extrato foi esterilizado por filtro de micromembrana milipore de 22µm no interior de capela de fluxo laminar. A solução foi diluída no decorrer dos dozes poços da placa da seguinte forma: 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19%, 0,09%, 0,04%, 0,02%.

Posteriormente, foi feito o Teste de Suscetibilidade Antifúngicos, por método de Microdiluição em Caldo, de acordo com a Norma M27-A2, a qual descreve o método preconizado pelo Comitê Nacional para Padrões de Laboratório Clínico (CNPLC), instituição internacional que desenvolve normas e padrões para a realização de testes de patologia clínica e questões relacionada a atenção à saúde (NCCLS, 2002). Esta etapa foi concretizada no Laboratório de Microbiologia da UNILAB.

Esse estudo teve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UNILAB, com CAAE 59953716.5.0000.5576 e número do parecer 1.937.092, regulamentando as cepas que foram utilizadas no estudo. Vale ressaltar que para esse trabalho foram garantidas autonomia dos sujeitos e não maleficência e beneficência da pesquisa, preconizadas na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

Os dados foram tabulados em Planilha Microsoft Office Excel 2013® para análise estatística e geração de gráficos e plotados para o Programas estatístico Statistical Package for the Social Sciences - SPSS versão 20.0, para a análise de estatística descritiva. Os valores obtidos foram expressos $\pm$ erro padrão médio (E.P.M), e para comparação entre as médias foi utilizada a análise de variância (ANOVA), com índice de significância de 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após realizados o ensaio de atividade antifúngica por técnica de microdiluição em caldo mostrou-se que a *C. albicans* ATCC90028 apresentou suscetibilidade a determinadas concentrações do extrato hidroalcólico de *Pereskia aculeata* Miller. Estudos utilizando essa espécie são bem escassos, contudo, Santos et al., (2010) mostrou em uma pesquisa que o extrato bruto de *P. aculeata* mostrou atividade inibitória contra bactérias da espécie *Enterococcus faecalis* apresentando um percentual de 0,8 cm de alo de inibição por técnica de disco de difusão.

Curiosamente ocorreu inibição de crescimento dessa espécie a nível de poço 1, 2 e 3 sendo equivalente a concentração de 12,5% (MIC) do extrato estudado. A comprovação ocorreu pela ausência de cepa no teste de CFM. Kanopka et al (2010) verificou que a espécie *C. albicans* ATCC 90028 possui como mecanismo de resistência a presença de biofilme, o que possibilitou na maioria dos estudos a perda de efeito principalmente quando ao flunonazol. Diante de tais informações, e por ser uma cepa que possui mecanismos de defesa, a utilização de produtos naturais pode se torna uma alternativa viável no combate a tal patógeno, seja este em compostos isolados ou extrato bruto como o utilizado nesse experimento.

Ainda nessa perspectiva, Moreira (2003) realizou ensaios utilizando a espécie padronizada utilizando drogas sintéticas. Seu estudo mostrou que ao longo do tempo a cepa em questão apresentou ainda mais estabilidade quando a curva concentração de fármaco adicionado. Nesse sentido, nota-se que o comportamento do fungo sofre uma adaptação. Souza (2016) afirma que por mais forte que seja a fiscalização pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, o uso indiscriminado de medicamentos ainda é bem presente, tanto no aspecto recorrente quanto na interrupção de esquema medicamentoso.

Diante do contexto, a espécie de planta *Pereskia aculeata* Miller produziu dentro de condições experimentais por meio da técnica de microdiluição em caldo, efeitos terapêuticos contra o fungo do gênero *Candida*, especificamente na espécie *C. albicans*, ATCC 90028. Contudo, essa pesquisa abre caminho para que mais experimentos sejam realizados visando entender o composto ou a substância que tende a promover tal efeito.

CONCLUSÕES

O estudo comprovou através da técnica de microdiluição em caldo que há inibição de crescimento do gênero *Candida*, correspondente a 12,5% na espécie *C. albicans* ATCC 90028 utilizando a concentração do extrato

hidroalcolico de *Pereskia aculeata* Miller. Dessa forma podemos entender que há uma possibilidade terapêutica desse produto natural, cabendo a realização de mais estudos envolvendo a temática com o intuito de elucidar questões e minimizar riscos ao uso futuro na prática clínica. Além disso, surge uma abordagem sustentável, já que produtos naturais são mais acessíveis e tende a causar menos efeitos colaterais em comparação com drogas industrializadas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB) por proporcionar subsídio a realização da pesquisa. Ao Sitio Vale da Biodiversidade pelo fornecimento da matéria prima essencial para o experimento. Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) pelo incentivo financeiro. Ao Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-Antrais (LAMOFOPA - UECE) pelo apoio material e técnico. E a todos os colaboradores do projeto desde os graduandos de iniciação científica até os docentes envolvidos.

REFERÊNCIAS

- ABDUL-WAHAB, S.N.; SIM, K.S.; ABD. WAHAB, N., 2009. Phytochemical and cytotoxic investigations of *Pereskia grandifolia* Haw. (Cactaceae) leaves. *Journal of Biological Sciences* 9, 488-493.
- ALBUQUERQUE, U.P. Implications of ethnobotanical studies on bioprospecting strategies of new drugs in semi-arid regions. *The Open Complementary Medicine Journal*, v. 2, p. 21-23, 2010.
- AVRELLA, D., GOULART, L. S. Isolamento de *Candida* spp. da mucosa oral de pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 40, p. 205-207. 2008.
- GARCÍA E & SOLIS I. (2007). *MANUAL DE FITOTERAPIA*. BARCELONA: ELSEVIER MASSON MARTINS AFG. (2010). fitoterapia na abordagem do risco cardiovascular: efeitos do extracto de arroz fermentado por *monascus purpureus* no perfil lipídico. (MASTER THESIS, UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR). Retirado em 11 de novembro 2013.
- GOH, K. I. *Malaysa Herbaceus Plantis Millenium Edition*. Advanço Press, Malaysia. 2010.
- KIM, D. M.; SUH, M. K.; HA, G. Y. Onychomycosis in children: an experience of 59 cases. *Annals of dermatology*, v. 25, n. 3, p. 327-334, 2013.
- KONOPKA, K.; DOROCKA-BOBKOWSKA, B.; GEBREMEDHIN, S.; DUZGUNES N. Susceptibility of *Candida* biofilms to histatin 5 and fluconazole. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2010;97(4):413-7.
- LEITE, J. P. V.; FERNANDES, J. M.; FAVARO, L. V; GONTIJO, D. C.; MAROTTA, C.P. B.; SIQUEIRA, L. C.; MAIA, R. T.; GARCIA, F. C. P., Plantas medicinais no entorno do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro. *MG. BIOTA*, v.1, n.4, p.16-34, 2008.
- NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição. Norma M27-A2 do NCCLS (ISBN 1-56238-469-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.
- PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S.; ALCICI, N. M. F. Estudo de alguns 542 componentes da própolis coletada por *Apis mellifera* no Brasil. *Arquivos de biologia e 543 tecnologia*, v. 38, n. 4, p.1253-1259, 1995.
- PISANO, C. L.; PAIVA, G. V.; PIZELLI G. S.; FERREIRA, J. D. Plantas medicinais, uso e cultivo domiciliar no município de Bauru-SP. *Ensaio e Ciência, Ciências biológicas Agraria e da Saúde*. V16, n.4, p.141-150, 2014.
- ROQUE, A.A.; ROCHA, R.M.; LOIOLA, M.I.B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (Nordeste do Brasil). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Botucatu*, v.12, n.1, p.31-42, 2010.
- SANTOS, A. G.; GARCIA, B. H.; SARTOR, C. F. P.; FELIPE, D. F. Estudo do efeito antimicrobiano do extrato bruto das folhas de *pereskia aculeata* mill. sobre patógenos bucais. ISBN 978-85-61091-69-9. 2010.
- TURAN, H.; DEMIRBILEK, M. Biofilm-forming capacity of blood--borne *Candida albicans* strains and effects of antifungal agentes. *Rev Argent Microbiol*. 2018;50(1):62---69 .
- SOUZA, R.; H.; F. RDC 20/2011 - O controle de antimicrobianos: O que podemos esperar?- (Monografia)

Universidade de Rio Verde, 2016.