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 ± 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 infeções, 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. È 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 hidroalcóolico 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 ºC. 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 Cº.

O extrato das folhas de *P. aculeata* foi obtido segundo metodologia usada por Kim et at. (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 hidroalcóolico 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 ± 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 hidroalcóolico 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 fecalis 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 cândida, 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

hidroalcóolico 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 Cientifica (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 cientifica 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. l. 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.