UTILIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE PERESKIA ACULEATA MILLER NA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA EM CANDIDA ALBICANS, GLABRATA E TROPICALIS.

Alesandro Silva Ferreira [1], Dayane Madalena Lima Romão [2], Francisco Glauber Peixoto Ferreira [3], Gabriela Silva Cruz [4], Juliana Jales de Hollanda Celestino [5]

RESUMO

A candidíase caracteriza-se como uma síndrome clínica que tem como agente causador o fungo do gênero Candida, tendo 200 variedades de leveduras diferentes, nos mais diversos ambientes de nichos corporais. Nesse contexto, plantas medicinais vêm sendo testadas para o combate de diferentes patologias, como por exemplo, para a candidíase, podendo destacar então dentre as plantas, a *Pereskia aculeata* Miller com diferentes efeitos terapêuticos. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar se o extrato hidroalcoólico das folhas de *Pereskia aculeata* Miller promove efeito antifúngico no combate ao gênero Candida, no que se refere às espécies *C. albicans, C. glabrata e C. tropicalis*. Para tanto, a pesquisa trata-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. As cepas foram semeadas em placas de Elisa de 96 poços, contendo ágar Sabouraud, meio de cultura para favorecer o crescimento de fungos leveduriformes e filamentosos. Foi utilizado o teste de atividade antifúngica pelo método microdiluição em caldo sobre as leveduras *Candida albicans, Candida tropicalis* e *Candida albicans ATCC 90028* em cepas advindas de cavidade oral, não sendo feito para C. glabrata, uma vez que ela não cresceu. Verificou-se no estudo que o extrato hidroalcoólico de *P. aculeata* produziu atividade de inibição em todas as linhagens em questão, sendo equivalente nas concentrações de 25% na espécie *C. albicans* e 12,5% na *C. tropicalis* e *C. albicans ATCC 90028*. O estudo comprovou através da técnica de microdiluição em caldo que há inibição de crescimento em algumas espécies do gênero Candida utilizando o extrato de *P. aculeata*. Dessa forma, a planta em questão pode torna-se uma alternativa terapeutica no combate a essas especies fúngicas

Palavras-chave:

Pereskia aculeata Miller. Atividade antifúngica. Candida ssp.

[1] UNILAB, Instituto de Ciências da Saúde, Discente, e-mail: silvaalesandro90@gmail.com
[2] UNILAB, Instituto de Ciências da Saúde, Discente, e-mail: madaromao52@gmail.com
[3] UNILAB, Mestrado Acadêmico em Sociobiodiversidade e Tecnologia Sustentável (MASTS), Discente, e-mail: fgpf.glauber@hotmail.com
[4] UFC, Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Discente, e-mail: gabreielacruz.gc7@gmail.com
[5] UNILAB, Instituto de 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 de Candida, principalmente as espécies *Candida albicans*, Candida não-albicans, como *C. glabrata, C. tropicalis, C. parapsilosis, C. krusei*; e recentemente analisada a *C. dubliniensis* (QUINDÓS, 2002; SIDRIM & MOREIRA, 1999; WHITE et al., 2004 apud AVRELLA & GOULART, 2008).

A espécie *Candida albicans* pode ser considerada, segundo estudos, a que provoca maior patogenicidade entre todas as espécies, e está frequentemente relacionada ao tipo de candidíase oral, e os fatores para o surgimento podem estar vinculados ao uso de antineoplásicos, baixando a imunidade do indivíduo, falta de higiene bucal, nutrição desequilibrada, corticoides e uso de antibióticos de largo espectro (LUIZ et al., 2008).

Já a espécie *glabrata* é bem comum em indivíduos imunocomprometidos, principalmente naqueles que permanece por um longo período de tempo em internação hospitalar, de modo em estado avançado causando uma taxa significativa de mortalidade (DIEKEMA et al., 2012). Outra bem citada pela literatura é a *Candida albicans ATCC 90028* trata-se de uma espécie padronizada em laboratório e tem como característica a produção de biofilme, e também determinada resistência a triazólicos, como é o caso do fluconazol (TURAN & DEMIRBILEK, 2018).

Outra espécie que merece também bastante atenção é a *Candida tropicalis* por possuir grande poder de infecção e bastante resistência às medidas farmacológicas já existentes, prejudicando uma série de tecidos no corpo humano, principalmente os rins em quadro já avançado da doença (WHIBLEY et al., 2015).

Dentre as inúmeras plantas com finalidade terapêutica, estão as do gênero Pereskia, que têm demonstrado um potencial promissor, especialmente no que se refere ao tratamento de certos tipos de cânceres e doenças cardiovasculares. Por serem plantas de valor nutricional, inclusive verificado em um estudo prévio pela nossa equipe (dados ainda não publicados), também têm sido utilizadas como fontes suplementares de alimentação para seres humanos e animais (SANTOS, 2010).

O gênero Pereskia é utilizado como medicamentos para tratar uma variedade de doenças, incluindo diabetes e hipertensão arterial, além de demonstrar efeitos antitumoral, antirreumático, anti-ulceroso e anti-inflamatório, com efeitos ainda para o alívio de dores de cabeça e gástrica, hemorroidas e dermatite atópica, servindo também para refrescar o corpo (GOH, 2000).

A *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. Na literatura existem relatos de uso contra processos inflamatórios e na recuperação de tecido tegumentar nos acidentes por queimaduras (SANTOS et al., 2010). Logo, essa pesquisa teve por objetivo avaliar se o extrato hidroalcóolico das folhas de *Pereskia aculeata* Miller promove efeito antifúngico no crescimento da Candida spp por meio da técnica de microdiluição em caldo.

METODOLOGIA

Tratou-se de um estudo descritivo, transversal e analítico com abordagem quantitativa. Amostras da planta *Pereskia aculeata* Miller foi coletada no Sítio Vale da Biodiversidade situado 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 acondicionadas em sala fria com temperatura média de -90 ºC.

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.
Foi feito o Teste de Suscetibilidade Antifúngica, por método de Microdiluição em Caldo. Esta etapa foi concretizada no Laboratório de Microbiologia da UNILAB. Para a preparação do inóculo, realizou-se a subcultura (repique) dos microrganismos, em tubos estéreis contendo ágar Sabouraud dextrose. A temperatura de incubação foi em torno de 35 °C. O inóculo foi preparado escolhendo-se três colônias de cultura de 24 horas de espécies de Candida. As colônias foram suspensas em 5 mL de solução salina estéril 0,145 mol/L (8,5g/L NaCl; salina a 0,85%). A suspensão resultante foi colocada em agitador de vórtex, durante 15 segundos, e a densidade celular ajustada com espectrofotômetro, acrescentando-se solução salina suficiente para obter a transmitância equivalente de uma solução-padrão da escala de McFarland 0,5, em comprimento de onda de 530 nm. Esse procedimento forneceu uma suspensão-padrão de levedura contendo 1 x 106 a 5 x 106 células por mL. A suspensão de trabalho foi produzida fazendo-se uma diluição 1:100, seguida de uma diluição de 1:20 da suspensão-padrão com meio líquido RPMI 1640, resultando em concentração de 5,0 x 102 a 2,5 x 103 células por mL.
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 (50 µL), e assim sucessivamente no decorrer de 12 poços da placa de microdiluição. O extrato foi esterilizado por filtro de micromembrana milipore de 22 µm, no interior da capela de fluxo laminar. O extrato foi diluído no decorrer dos doze 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%, 0,01%.
O teste de microdiluição foi realizado em placas estéreis e descartáveis, contendo 96 poços em formato de U. As concentrações do extrato em questão foram pipetadas em diluição seriada nos poços das fileiras verticais A, B e C cepa 1 *(Candida albicans)*, D, E e F cepa 2 *(Candida tropicalis)*, G (controle positivo cepa 1) H (controle positivo cepa 2), I (controle negativo). Utilizou-se uma segunda placa sendo esquematizado da seguinte forma, poços A, B e C cepa 3 *(Candida albicans ATCC 90028)*, já os poços D ficou com controle positivo da cepa 3 e E para o controle negativo da placa. O volume colocado foi correspondente a 100 µL, por meio de uma pipeta multicanal. A fileira horizontal 1 conteve a maior concentração do extrato hidroalcóolico e a 12 a menor concentração.
Cada poço da placa de microdiluição foi inoculado, no dia do teste, com 100 µL da correspondente suspensão 2X concentrada do inóculo. Os poços controle de crescimento continham 100 µL de meio estéril, isento do extrato, e foram inoculados com 100 µL das suspensões 2X concentradas dos inóculos. A última fileira da placa de microdiluição foi usada para efetuar o controle da esterilidade, utilizando apenas o meio RPMI isento de extrato.
As placas de microdiluição foram incubadas a 35 °C, observando presença de crescimento visível. A leitura dos resultados foi realizada após 24 a 48 horas. Os poços de microdiluição receberam uma pontuação (escore) de acordo com o crescimento da levedura observado em cada poço e este foi comparado ao poço controle positivo do crescimento (isento de extrato), com auxílio de um espelho de leitura. Seguindo, cada poço da placa de microdiluição recebeu um valor numérico, usando a seguinte escala: 0 - opticamente claro; 1 - crescimento indefinido; 2 - redução proeminente de crescimento; 3 - ligeira redução do crescimento; 4- nenhuma redução do crescimento.
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. Os dados foram tabulados em Planilha Microsoft Office Excel 2013® para análise estatística e geração de gráficos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após realizado o ensaio de atividade antifúngica por técnica de microdiluição em caldo, mostrou-se que todas as cepas apresentaram suscetibilidade a determinadas concentrações do extrato hidroalcóolico de *Pereskia aculeata* Miller. Um ponto importante em questão é com relação a substituição da cepa *Candida glabrata* pela espécie *Candida albicans ATCC90028*, o principal motivo se remete a indisponibilidade em laboratório utilizado. Contudo, tal ação teve determinado grau de relevância, principalmente pela última ser muito

utilizado em estudos antifúngicos, inclusive como cepa controle.
Verificou-se que na espécie *C. albicans* houve inibição de crescimento no poço 3, ou seja, Concentração Inibitória Mínima (CIM) em 25% do extrato de *P. aculeata*. Contudo, após realizado o teste de Concentração Fungicida Mínima (CFM) com Ágar batata, houve crescimento de cepas no tubo correspondente ao referente poço, cabendo ressaltar que não houve presença do fungo nos poços 1 e 2 da espécie em questão. Para descartar a possibilidade de contaminação, realizou-se coloração de Gram, tendo como resultado a comprovação de Candida albicans por meio da análise morfológica microscópica.
Contrariamente aos nossos dados, Santos et al. (2011) não atingiram resultados promissores ao utilizar o extrato bruto das folhas de *P. aculeata* em *Candida albicans ATCC 18804* e *448858*. No entanto, por mais que em testes microbiológicos a planta tenha sido pouco explorada, Pinto et al. (2012) comprovaram em seu estudo que a P. aculeata possui atividade citotóxica contra determinados tipos de células cancerígenas, demostrando também que o uso da planta não causa danos a células de linhagem normais, ou seja, estabelecendo uma margem de segurança quanto ao seu uso em situações específicas. Dessa forma, estudos antimicrobiano devem ser aprofundados no intuito de elucidar.
Já com relação à espécie *C. tropicalis*, não houve crescimento até o poço 3 (MIC) na direção de maior para menor proporção do extrato, avaliando que 12,5% da concentração foi capaz de inibir tal atividade, comprovando também que nos poços anteriores da placa dessa espécie não houve presença do fungo (CFM). Na literatura não há muitos relatos de atividade antifúngica envolvendo essa espécie de planta em especifico, porém, Turra et al., (2007) utilizou em seu experimento a espécie *Pereskia grandifolia* no fungo Candida, especificamente *C. albicans,* ao qual não apresentou nenhuma sensibilidade. Se torna interessante a realização de mais estudos envolvendo *P. aculeata*, já que essa espécie apresentou resultados bem promissores em nosso estudo quando se trata do fator sensibilidade e inibição de crescimento.
Na espécie *Candida albicans ATCC 90028* ocorreu inibição de crescimento nos poços 1, 2 e 3, sendo equivalente à concentração de 12,5% (MIC) do extrato estudado. A comprovação ocorreu pela ausência de cepa no teste de CFM. Kanopka et al. (2010) verificaram 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 quanto ao Fluconazol. Diante de tais informações, essa espécie apresentou inibição de crescimento no presente estudo, por mais que possua tal mecanismo de resistência.

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*, enquanto que na *C. tropicalis* e *C. albicans ATCC 90028* foi em torno de 25% da concentração do extrato hidroalcóolico de *Pereskia aculeata* Miller.
Dessa forma, pode-se 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, abrindo caminho para que mais experimentos sejam realizados, visando entender o composto ou a substância que tende a promover tal efeito.

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

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.
DIEKEMA, D.; ARBEFEVILLE, S.; BOYKEN, L.; KROEGER, J.; PFALLER, M. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2012;73(1):45–8. Epub 2012/05/15. pmid:22578938.
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.
LUIZ, A. C.; EDUARDO, F. P.; BEZINELLI, L. M.; CORREIA, L. Alterações bucais e cuidados orais no paciente transplantado de medula óssea. REV. Bras. de hematol. E hemoter., v.30, n.6, p.480-487, 2008.
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, 1995;38(4):1253-1259.
PINTO, N. C. C.; SANTOS, R. C. A.; MACHADO, D. C.; FLORÊNCIO, J. R.; FAGUNDES, E. M. S.; ANTINARELLI, L. M. R.; COIMBRA, E. S.; RIBEIRO, A.; SCIO, E. A. Cytotoxic and antioxidant activity of pereskia aculeata miller . Archives, 2012. vol.3. 63 – 69.
QUINDÓS, G. Las micosis en el amanecer del siglo XXI. Rev. Iber. Micol., 9, p. 1- 4. Ribeiro, L. et al. (2004). Aspectos das leveduras de Candida vinculadas às infecções nosocomiais. NewsLab, 64 (3), p. 106-128. 2002.
SANTOS, A. G.; TIBURCIO, C. S.; SARTOR, C. F. P.; CORTEZ, L. E. R. Avaliação das atividades antimicrobiana sobre patógenos bucais e hemolítica das folhas de Pereskia aculeata. ISBN 978-85-8084-055-1. Out. 2011.
SANTOS, A. G.; TIBURCIO, C. S.; SARTOR, C. F. P.; CORTEZ, L. E. R. Avaliação das atividades antimicrobiana sobre patógenos bucais e hemolítica das folhas de pereskia aculeata out. 2011.. ISBN 978-85-8084-055-1.
SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. Fundamentos clínicos laboratoriais da micologia médica. Guanabara Koogan. 1999.WHITE, P. L. et al. Detection of Candida in concentrated oral rinse cultures by realtime PCR. J. Clin. Microbiol, 2004;42(5):2101-2107.
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.
TURRA, A. F.; MARÇAL, F. J. B.; BARETTA, I. P.; TAKEMURA, O. S.; LAVERDE-JR, A. Avaliação das propriedades antioxidantes e susceptibilidade antimicrobiana de Pereskia grandifolia Haworth (cactaceae). Arq. Ciênc. Saúde Unipar, Umuarama, 2007;11(1):9- 14.
WHIBLEY, N.; JILLIAN, R.; REID, J. D.; ABHISHEK, V. G.; TAYLOR, J. A.; CORNELIUS, J.; CLANCY, M. H.; NGUYEN, P. S.; BISWAS, M. J.; MCGEACHY, G. D.; BROWN, S. L. G. Delinking CARD9 and IL-17: CARD9 Protects against Candida tropicalis Infection through a TNF-a–Dependent, IL-17–Independent Mechanism. J Immunol 2015; 195:3781-3792.