

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA IN VITRO DE INFUSÕES DE PLANTAS MEDICINAIS FRENTE A LEVEDURAS ISOLADAS DE SECREÇÃO VAGINAL

José Ewerton Felinto dos Santos¹; Bruno Severo Gomes²

¹Estudante do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas - CCB – UFPE; E-mail: jewerton.santos@hotmail.com, ²Docente/pesquisador do Depto de Micologia - CCB — UFPE. E-mail: bseverogomes@gmail.com.

Sumário: A utilização de plantas para fins terapêuticos é uma prática utilizada desde os primórdios da espécie humana, às vezes o único recurso terapêutico, é difundido entre gerações pelo conhecimento popular. No tratamento das micoses humanas alguns antifúngicos disponíveis além de causarem resistência ao micro-organismo podem causar recorrência, e toxicidade ao organismo humano, o que impulsiona a busca por novas alternativas terapêuticas eficientes, seguras e naturais. O objetivo do presente estudo é analisar a atividade antifúngica *in vitro* da infusão e dos extratos vegetais utilizando álcool de cereais e álcool etílico de Camomila (*Matricaria recutita* L.), Erva-Doce (*Pimpinella anisum* L.), Hortelã (*Mentha piperita* L.) e Boldo-do-Chile (*Peumus boldus*) frente a leveduras isoladas de amostras clínicas pertencentes ao gênero *Candida sp.* e *Rhodotorula*. A atividade antimicrobiana foi verificada *in vitro* pelo método difusão em disco de papel. Os resultados obtidos no trabalho permitiram verificar que extratos de álcool etílico e cereais das plantas utilizadas apresentaram potencial antifúngico.

Palavras-chave: Fungos; Micologia; Mucose; Microbiologia.

INTRODUÇÃO

A utilização de plantas para fins terapêuticos é uma prática utilizada desde os primórdios da espécie humana, sendo em muitas comunidades às vezes o único recurso terapêutico, que é difundido entre as gerações através do conhecimento popular (LUBIAN, et. al, 2010; OLIVEIRA e ARAUJO, 2009; SOARES et. al, 2015). As plantas são fontes extremamente ricas de biomoléculas naturais (MARTINS, et. al, 2015). Segundo o Ministério da Saúde, 2006, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece que 85% da população dos países em desenvolvimento utilizam de práticas tradicionais como o uso de plantas medicinais. No Brasil, encontramos maior parcela de biodiversidade mundial de plantas superiores, em torno de 24%, atrelado a uma diversidade étnica e cultural, que em conjunto aos conhecimentos mais tradicionais, nos oferece uma excelente fonte de matéria prima para fabricação e desenvolvimento de novas tecnologias fitoterápicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Apesar dessa imensa riqueza de produtos naturais, ainda são escassos os estudos (FARIAS, 2006). Segundo, Fenner, et. al, 2006, as micoses humanas possuem um tratamento pouco eficaz, uma vez que os fármacos antifúngicos disponíveis além de causarem resistência ao micro-organismo podem causar recorrência, e toxicidade ao organismo humano, o que impulsiona busca por novas alternativas terapêuticas mais eficientes, seguras e naturais. O que evidencia a importância de maiores investimentos em pesquisas para busca de novos fitoterápicos que sejam aplicados para os mais diversos fins, inclusive no tratamento de infecções fungicas (micoses). O interesse acadêmico sobre as plantas medicinais vem crescendo constantemente, devido especialmente pela comprovação empírica (OLIVEIRA, 2010). Cerca de 25% dos medicamentos produzidos no Brasil são derivados de plantas medicinais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012), a

exemplo os estudos conduzidos por MAHESH e SATISH (2008), MENDES et al. (2010), LIMA et al. (2006), ARAÚJO (2010), FARIAS (2006), BENFATTI et al. (2010), LUBIAN et al. (2010) e LIMA et al. (2006) que comprovaram o efeito antimicrobiano e antifúngico das plantas medicinais. Dessa forma, objetivo do presente estudo é analisar a atividade antifúngica *in vitro* da infusão e dos extratos vegetais utilizando álcool de cereais e álcool etílico de Camomila (*Matricaria recutita* L.), Erva-Doce (*Pimpinella anisum* L.), Hortelã (*Mentha piperita* L.) e Boldo-do-Chile (*Peumus boldus*) frente a leveduras de secreção vaginal.

MATERIAIS E MÉTODOS

As culturas foram transferidas para caldo glicosado e mantidos a temperatura ambiente a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante três dias. Após crescimento das células fungicas, houve o repique para o meio de cultivo ágar Sabouraud contidos em tubos de ensaio, mantidos por mais 5 dias em temperatura ambiente a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Foram observadas características macroscópicas, microscópicas e quando necessário características fisiológicas das colônias seguindo os critérios contidos em Lodder (1970); Kreger van Rij (1984); Kurtzman; Fell (1998) e Barnett et al. (2000). As plantas foram adquiridas em embalagens comerciais e processadas industrialmente. Foram utilizados os capítulos florais de camomila (*Matricaria recutita*, L.), frutos de erva-doce (*Pimpinella anisum*), folhas e ramos de hortelã (*Mentha piperita*, L.) e folhas de boldo do Chile (*Pneumus boldus*, Molina). O extrato aquoso a quente (infuso) foi preparado com 180mL de água destilada em 25 gramas da planta sob controle de temperatura a 50°C , para não perder nenhum princípio ativo da planta (SILVA, et al., 1986). O infuso foi preparado vertendo-se água fervente sobre o material botânico, fechando o recipiente que permaneceu em repouso por quinze minutos, com posterior filtração (SCHUCK et al., 2001). As outras formas de extrato foram preparadas pelo método da maceração com utilização de álcool de cereais e álcool etílico (soluções extratoras), onde a proporção de pó da planta foi de 25 gramas para cada 200 mL de solução extratora. Essas soluções extratoras permaneceram em contato com o pó durante oito dias, sob agitação em shaker (temperatura 27°C e rotação de 1,0 rpm), em um frasco de vidro âmbar para evitar possível interferência da luz e sob temperatura ambiente aproximada de 25°C (SIMÕES, et al., 2001). A atividade antimicrobiana foi verificada *in vitro*, frente a 10 micro-organismos pelo método de difusão em disco de papel (BAUER et al., 1966). As 10 culturas de leveduras pertencentes aos gêneros *Candida* e *Rhodotorula* foram isoladas de amostras clínicas (secreção vaginal) de mulheres grávidas e não grávidas, com e sem sintomas. As leveduras encontram-se preservadas na Micoteca URM do Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, preservados sob óleo mineral (SHERF, 1943). Os micro-organismos teste foram padronizados pela turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland em solução fisiológica (BARRY, 1986; KONEMAN, 1997), correspondente a uma concentração de aproximadamente 10^7 UFC/mL para leveduras e semeadas na superfície do meio ágar Sabouraud contidos em placa de Petri. Sobre o semeio foram posicionados de forma equidistantes discos de papel xarope esterilizados, de 6 mm de diâmetro, embebidos com 10 μL da solução do extrato. As placas foram incubadas durante 24 h e 48 h à temperatura de 27°C e 37°C . Todos os extratos foram testados em triplicata e os diâmetros dos halos expressos pela média dos resultados obtidos nas três repetições. Como controle negativo, foram utilizados discos de papel filtro saturado com 10 μL dos diluentes utilizados. O controle positivo foi realizado com discos de papel filtro embebidos de 10 μL nistatina. Halos iguais e superiores a 10 mm foram considerados significativos de atividade antibiótica (AWADH Ali et al., 2001; BAKSHU et al., 2001; KHAN et al., 2001 e CHOWDHURY et al., 2002; FERRONATTO et al., 2007; SILVA et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2007). A avaliação consistiu na a média do diâmetro dos halos de

inibição. As placas de Petri foram avaliadas a partir da repicagem do microrganismo até o 10º dia. A mensuração do diâmetro ocorreu com auxílio de paquímetro de precisão. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 4 tratamentos e 3 repetições para cada tratamento. Foram utilizados os testes F e de Tukey para verificação da significância para as médias do crescimento da colônia, utilizando o software assistat-statistical (SILVA & AZEVEDO, 2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram reativadas e confirmadas taxonomicamente 10 culturas: URM 739 *Candida catenulata* Diddens & Lodder, URM 741 *Candida brumptii* Lang & Guerra, URM 4970 *Candida parapsilosis* (Ashford) Lageron & Talice, URM 4975 *Candida guilliermondii* (Castellani) Langeron et Guerra, URM 4976 *Candida maritima* (Siepmann) Van Uder & Buckley (Meyer & Ahearn), URM 4978 *Candida shehatae* Buckley & Van Uden, URM 4990 *Candida albicans* (Robin) Berkout, URM 5187 *Rhodotorula minuta* (Saito) Harrison, URM 5189 *Candida tropicalis* (Castellani) Berkhout, URM 5974 *Candida albicans* (Robin) Berkhout (1923). Dos resultados obtidos pode-se observar que apenas o extrato de hortelã sofreu influência da temperatura sob sua atividade antifúngica, tendo a temperatura de 27°C como melhor potencialidade. Das quatro plantas utilizadas no experimento, apenas os extratos de álcool etílico e de cereais apresentaram atividades antifúngica. Observa-se na tabela 01 e tabela 02 que o extrato com álcool etílico se configurou como o mais eficiente com a Camomila, Hortelã e Erva Doce, e o extrato de álcool de cereais com Boldo do Chile. Verificou-se que todas leveduras de amostras clínicas foram bastante sensíveis ao antifúngico.

Tabela 02: Comparação das médias dos halos dos extratos das plantas medicinais analisadas frente a leveduras de secreção vaginal em meio ágar Sabouraud em duas temperaturas, durante dez dias.

BOLDO		ERVA DOCE		HORTELÃ		CAMOMILA	
Extrato		Extrato		Extrato		Extrato	
Álcool Etílico	Álcool de Cereais						
0.16000 b	0.58333 a	0.83667a	0.46500b	0.76333a	0.29333b	0.74167a	0.28000b
dms =0.12780		dms =0.14556		dms =0.12780		dms =0.12021	

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste Tukey $\leq 5\%$. Todas as médias foram mensuradas em centímetros.

Tabela 03: Comparação das médias dos halos dos extratos das plantas medicinais com o controle positivo frente a leveduras de secreção vaginal em meio ágar Sabouraud em duas temperaturas, durante dez dias, como controle positivo

Tratamentos	Hortelã	Camomila	Boldo do Chile	Erva Doce
Controle Positivo	1.39000 a	1.39000 a	1.39000 a	1.39000 a
Álcool Etílico 27°C	0.79333 b	0.77000 b	0.17000 c	0.82000 b
Álcool Etílico 37°C	0.73333 b	0.71333 b	0.15000 c	0.85333 b
Álcool de cereais 27°C	0.43333 c	0.32000 c	0.59000 b	0.47667 c
Álcool de cereais 37°C	0.15333 d	0.24000 c	0.57667 b	0.45333 c
DMS	0.22717	0.21384	0.17981	0.25837

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste Tukey $\leq 5\%$. Todas as médias foram mensuradas em centímetros.

A cultura URM 4975 *C. guilliermondii*, e as duas culturas de *C. albicans* URM 5974 e URM 4990 foram bastante sensíveis ao extrato de álcool etílico de camomila em ambas temperaturas, em contrapartida o extrato de álcool de cereais não apresentou atividade antifúngica significativa nestes isolados. Em seu estudo Silva, 2010 demonstrou atividade antimicrobiana de extrato de camomila frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, comprovando seu potencial antimicrobiano. O extrato de álcool etílico de

Erva Doce apresentou uma boa atividade fungistática sob URM 741 *C. brumptii*, URM 4970 *C. parapsilosis*, URM 4990 *C. albicans* URM 4976 *C. maritima*, URM 4975 *C. guilliermondi*, URM 5974 *C. albicans*. Pesquisas como a Sartori 2013, comprova o potencial antifúngico do extrato etanólico de Boldo do Chile em fungos como *Alternaria* sp. As culturas URM 741 *C. brumptii*, URM 5974 *C. albicans* foram bastante sensíveis em ambas temperaturas ao extrato de Boldo do Chile de álcool de cereais, confirmando seu potencial antifúngico, o que Lima et al., em 2006 relataram a eficiência antifúngica do óleo essencial de Boldo do Chile frente culturas de *C. albicans*, *C. parapsilosis*. No teste realizado com o extrato de álcool etílico de hortelã, as culturas de *C. albicans* apresentaram sensibilidades diferentes aos extratos de hortelã, o isolado URM 5974 *C. albicans* foi mais susceptível ao extrato de álcool etílico, enquanto URM 4990 *C. albicans* foi menos sensível ao extrato. Matos et al, 2009, testaram extrato alcoólico de hortelã a 37°C frente a amostras clínicas de *Candida* sp., apresentando atividade fungicida sob *C. albicans*, comprovando sua atividade fungicida.

CONCLUSÕES

Os extratos de Camomila (*Matricaria recutita* L.), Erva-Doce (*Pimpinella anisum* L.), Hortelã (*Mentha piperita* L.) e Boldo-do-Chile (*Peumus boldus*) utilizando álcool etílico e álcool de cereais possuem atividade antifúngica frente às culturas de leveduras isoladas de amostras clínicas. Os resultados deixam o campo aberto para a realização de futuros estudos de isolamento e identificação dos compostos bioativos dos extratos.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ, UFPE, Micoteca URM, Departamento de Micologia.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, N. R. R. 2010. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre microrganismos relacionados à lesão de mucosite oral. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pará, Pará.
- BENFATTI, C. S., CORDOVA, S. M. D., GUEDES, A., MAGINA, M. D. A., & CORDOVA, C. M. M. D. 2010. Atividade antibacteriana *in vitro* de extratos brutos de espécies de *Eugenia* sp frente a cepas de mollicutes. Revista Pan-Amazônica de Saúde, v. 1, n. 2, p. 33-39.
- E., BATISTA M. R. 2005. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. Rev Bras Ginecol Obstet, v. 27, n. 2, p. 58-63.
- FARIAS, E. M. F. G. 2006. Avaliação da atividade antifúngica de *Lippia sidoides* cham. (Verbenaceae) para obtenção de um creme de aplicação vaginal. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- FERRAZZA M. H. S. H., MALUF M. L. F., CONSOLARO, M. E. L., SHINOBU C. S., SVIDZINSKI T. I.
- LIMA, I. O., OLIVEIRA, R. D. A. G., LIMA, E. O., FARIAS, N. M. P., SOUZA, E. L. 2006. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 16, n. 2, p. 197-201.
- LIMA, M. R., XIMENES, E. C., LUNA, J. S., & SANT'ANA, A. E. G. 2006. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 16, n. 3, p. 300-306.
- LUBIAN, C. T., TEIXEIRA, J. M., LUND, R. G., NASCENTE, P. S., & DEL PINO, F. A. B. 2010. Atividade antifúngica do extrato aquoso de *Arctium minus* (Hill) Bernh.(*Asteraceae*) sobre espécies orais de *Candida*. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 12, n. 2, p. 157-162.
- MAHESH, B.; SATISH, S. 2008. Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens. World journal of agricultural sciences, v. 4, n. 5, p. 839-843.
- MARTINS, N., BARROS, L., HENRIQUES, M., SILVA, S., & FERREIRA, I. C. 2015. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. Industrial Crops and Products. Industrial Crops and Products, v. 74, p. 648-670.
- MATOS, B. M., KOMIYAMA, E.Y., BALDUCCI, I., KOGA-ITO, C. Y. 2009. Atividade antifúngica do extrato alcoólico de *Mentha piperita* sobre *Candida albicans* e *C. tropicalis*. Rev Odontol UNESP (Araraquara), v. 38, p. 244-8.
- MENDES, L. P. M., MACIEL, K., VIEIRA, A. B. R., MENDONÇA, L. C. V., SILVA, R., ROLIM-NETO,
- OLIVEIRA, C. J., ARAUJO, T. L. 2009. Plantas medicinais: usos e crenças de idosos portadores de hipertensão arterial. Revista Eletrônica de Enfermagem, v. 9, n. 1.
- OLIVEIRA, F. C. S.; BARROS, R. F. M.; MOITA NETO, J. M. 2010. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 12, n. 3, p. 282-301.
- P. J., BARBOSA, W.L.R., VIEIRA, J. 2011. Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *peperomia pellucida* e *portulaca pilosa*. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 32, n. 1, p. 121-125.

- SARTORI, V. C., BIONDO, F., PANSERA, M. R., & SILVA-RIBEIRO, R. T. 2013. 13871-Atividade biológica de aveloz (*Euphorbia tirucalli*), boldo (*Peumus boldus*) e cânfora (*Cinnamomun camphora*) sobre *Alternaria* sp e *Fusarium* sp. Cadernos de Agroecologia, v. 8, n. 2
- SILVA, F.A.S., AZEVEDO, C.A.V. 2009. Principal components analysis in the software assistat-statistical assistance. In: 7th World Congress on Computers in Agriculture, 2009, Reno. Proceedings of the 7th World Congress on Computers in Agriculture. St. Joseph: ASABE., CD-Rom. pp.1-5.
- SILVA, N. C. C. 2010. Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- SOARES, F., FREIRE, N., & SOUZA, T. 2015. Avaliação farmacognóstica e da rotulagem das drogas vegetais boldo-do-chile (*Peumus boldus Molina*) e camomila (*Matricaria recutita L.*) comercializadas em Fortaleza, CE. Rev. bras. plantas med, v. 17, n. 3, p. 468-472.