



Atividade anti-*Candida* de extratos e frações de espécies da família Asteraceae

Anti-*Candida* activity of extracts and fractions of species from Asteraceae family

Julia Chiqueti*, Tatiana Shioji Tiuman†

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo determinar a atividade antifúngica de extratos e frações de algumas plantas da família Asteraceae, utilizando os métodos de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM). As plantas utilizadas foram *Vernonanthura cuneifolia*, *Vernonanthura discolor*, *Stevia leptophylla* e *Austro eupatorium inulaefolium*. As amostras foram dos extratos e frações foram fornecidas pelo Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá. As partes aéreas das plantas foram submetidas ao processo de extração por maceração exaustiva com etanol. Após, cada extrato foi submetido ao processo de fracionamento por partição com n-hexano, diclorometano (ou clorofórmio) e acetato de etila e butanol. Para avaliação da atividade antifúngica, foram preparadas soluções como extratos na concentração de 10 mg/mL, os quais foram testados contra as leveduras *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*. As frações que tiveram a maior atividade na concentração de 2,5 mg/mL foram AI-FAC e VC-FDC para as leveduras de *C. tropicalis* e *C. glabrata* e SL-FAC para *C. krusei*. Já os extratos brutos e frações VD-EB, SL-CHCl₃ e SL-AC apresentaram CIM de 5,0 mg/mL para as quatro leveduras testadas. Com isso, é possível observar que os extratos naturais devem ser mais estudados e explorados com o intuito de desenvolver novas substâncias antifúngicas.

Palavras-chave: Concentração inibitória mínima, *Vernonanthura cuneifolia*, *Vernonanthura discolor*, *Stevia leptophylla*, *Austro eupatorium inulaefolium*.

ABSTRACT

This work aimed to determine the antifungal activity of extracts and fractions of some plants of the Asteraceae family, using the methods of determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC). The plants used were *Vernonanthura cuneifolia*, *Vernonanthura discolor*, *Stevia leptophylla* and *Austro eupatorium inulaefolium*. The samples of extracts and fractions were provided by the Department of Chemistry at the State University of Maringá. The aerial parts of the plants were submitted to the extraction process by exhaustive maceration with ethanol. Afterwards, each extract was submitted to the fractionation process by partition with n-hexane, dichloromethane (or chloroform) and ethyl acetate and butanol. To evaluate the antifungal activity, solutions were prepared with extracts at a concentration of 10 mg/mL, which were tested against *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* and *Candida glabrata* yeasts. The fractions that had the highest activity at the concentration of 2.5 mg/mL were AI-FAC and VC-FDC for *C. tropicalis* and *C. glabrata* yeasts and SL-FAC for *C. krusei*. The crude extracts and fractions VD-EB, SL-CHCl₃ and SL-AC presented MIC of 5.0 mg/mL for the four tested yeasts. Thus, it is possible to observe that the natural extracts should be further studied and explored in order to develop new antifungal substances.

Keywords: Minimum inhibitory concentration, *Vernonanthura cuneifolia*, *Vernonanthura discolor*, *Stevia leptophylla*, *Austro eupatorium inulaefolium*.

* Tecnologia em Processos químicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil; julachiqueti@hotmail.com

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Toledo; tatianatiuman@utfpr.edu.br



1 INTRODUÇÃO

É possível dizer que a descoberta das plantas medicinais teve sua origem junto à humanidade, e até os dias de hoje são utilizadas para combater várias doenças. Essas plantas são utilizadas como recursos terapêuticos, na busca por desenvolvimento de novos fitoterápicos e no estudo da documentação de plantas. São analisadas como são percebidas pela população, identificando sua importância na medicina tradicional e contemporânea e a incorporação dessas plantas na saúde pública (PIRES et al., 2014).

Com isso, torna-se importante promover o adequado uso das plantas medicinais, estudando possíveis doenças, possibilidades de tratamento com esses recursos e fortalecimento de programas educacionais de saúde que forneçam a eficácia, segurança e qualidade das plantas, auxiliando assim tanto os profissionais de saúde a implementar esses recursos naturais nativos, quanto a população para utilizar de forma mais correta e segura.

A família Asteraceae é conhecida por suas propriedades ornamentais, medicinais, apícolas, oleaginosas, aromáticas, inseticidas e comestíveis, sendo utilizada na medicina como anti-helmíntico, anti-inflamatório, adstringente, colestérico, anti-hemorrágico, antimicrobiano, diurético, analgésico e antiespasmódico (BERETTA et al., 2008). Asteraceae é uma das maiores e mais importante famílias de plantas tendo cerca de 1.600 gêneros e 23.000 espécies. No Brasil temos aproximadamente, 180 gêneros e 1.900 espécies, distribuídas em diferentes formações vegetativas, tendo os estados Minas Gerais e Bahia a maior porcentagem de representatividade (ROQUE; BAUTISTA, 2008).

Candida é uma levedura responsável por causar colonização e assim infecções fúngicas superficiais no aparelho digestivo, respiratório, mucosa vaginal, oral e tegumento cutâneo. O gênero Candida tem aproximadamente 163 espécies, e é conhecida desde o tempo de Hipócrates, mas somente a partir de 1988 foram registrados os maiores índices de infecções por essa levedura tendo como principais vítimas pacientes neutropênicos, prematuros e internados em UTIs (CASTRO et al., 2006).

Contagem de linfócitos T-CD4 abaixo de 200 células/mm³, tabagismo, uso de terapia imunossupressora, antibioticoterapia, procedimentos cirúrgicos, idade, desnutrição, higiene precária, xerostomia e diabetes mellitus são alguns fatores que favorecem o surgimento de Candida nas micoses. Estudos apontam que aproximadamente 80% da população apresentam alguma espécie desse fungo no tubo gastrointestinal, 20 a 30% das mulheres apresentam alguma doença vaginal causada pela Candida e 80% das infecções hospitalares são oriundas das contaminações desse fungo, visto que ainda há dificuldade no seu diagnóstico e agentes terapêuticos para infecções causadas por esse microrganismo (SOBREIRA, A.L.C. et al., 2020).

Com base no exposto, este trabalho teve como objetivo estudar as propriedades antifúngicas de extratos e frações de plantas da família Asteraceae contra algumas espécies de Candida, com a finalidade de se obter novas fontes de substâncias para o combate das doenças causadas por essa levedura.

2 MÉTODO

As amostras dos extratos e frações das plantas analisadas foram gentilmente cedidas pela Universidade Estadual de Maringá (Departamento de Química). As plantas foram coletadas na região de Campos Gerais no município de Ponta Grossa, Paraná, no período de março de 2018 a junho de 2019. As plantas foram identificadas e uma amostra está depositada no herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

As plantas utilizadas foram *Vernonanthura cuneifolia* (VC), *Vernonanthura discolor* (VDI), *Stevia leptophylla* (SL) e *Austroeupatorium inulaefolium* (AI). As partes aéreas foram submetidas ao processo de extração por maceração exaustiva com etanol e o fracionamento foi realizado pelo método de partição



utilizando solventes com polaridades crescentes (n-hexano, diclorometano (ou clorofórmio), acetato de etila e butanol.

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), com o objetivo de definir a maior diluição dos extratos na inibição dos microrganismos, foram utilizadas as leveduras *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*.

Para preparação dos extratos, foi pesado em microtubos de centrifugação aproximadamente 10 mg de cada extrato, calculado o volume necessário de solvente, sendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 90% de meio caldo RPMI, para a concentração final ser de 10 mg/mL. O extrato foi homogeneizado em agitador com DMSO até completa dissolução e depois completado com caldo Rosewell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640), tamponado com 0,165 mol/L de solução tampão ácido-3-(N-morfolino)propanossulfônico.

As leveduras foram repicadas 24 horas antes do experimento em caldo Sabouraud e padronizadas com a escala 0,5 de Mc Farland. Depois, foram diluídas na proporção 1:20 para se obter uma concentração de aproximadamente 5×10^4 células/mL.

Na placa de 96 poços, foi adicionado a cada poço 100 µL de caldo RPMI-1640, após isso, na linha A foi adicionado 100 µL do extrato, e realizado a diluição seriada (1:2) até a linha G, sendo homogeneizado e descartado 100 µL. Após isso, foi adicionado 10 µL da suspensão fúngica em cada poço. Na linha H, não é adicionado o extrato, visto que é a linha de controle do crescimento das leveduras, sendo adicionado assim somente o caldo RPMI-1640 e a levedura de análise. As análises foram realizadas em triplicatas.

Depois de homogeneizado, as placas foram incubadas em estufa a 35 °C por 24 horas. Após, é feita uma leitura do crescimento a olho nu, em que observa-se onde não teve crescimento fúngico para se determinar a CIM. Destes poços, são realizados subcultivos em agar Sabouraud e incubado a 35°C em estufa para a determinação da CFM. Finalmente, são adicionados 10 µL em cada poço de uma solução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT) a 1,0 % em água, e as placas são novamente incubadas por 3 horas em estufa a 35 °C para confirmar a leitura visual, uma vez que o CTT é uma substância que é reduzida pelos microrganismos, se estiverem em grande quantidade, e promovem a formação de um composto colorido rosa.

3 RESULTADOS

Os resultados obtidos após as microdiluições para avaliação da CIM e CFM dos extratos e frações, demonstraram diferentes potenciais para as soluções testadas contra os quatro microrganismos. A maioria dos extratos e frações não apresentou atividade na maior concentração testada (5,0 mg/mL), de modo que as frações que tiveram a maior atividade na concentração de 2,5 mg/mL foram AI-FAC e VC-FDC para as leveduras de *C. tropicalis* e *C. glabrata* e e SL-FAC para *C. krusei*. Já os extratos brutos e frações VD-EB, SL-CHCl₃ e SL-AC apresentaram CIM de 5,0 mg/mL para as quatro leveduras testadas (Tabela 1).

A CIM de 5,0 mg/mL foi encontrada em SL-FBuOH para *C. albicans*, AI-FAC para *C. albicans* e *C. krusei* e VC-EB para *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. Já os demais extratos e frações não apresentaram CIM nas concentrações testadas (Tabela 1).

Para a análise de controle positivo para os testes de CIM realizados, foi preparada uma placa de microdiluição contendo o antifúngico nistatina na concentração de 1 mg/mL. O controle realizado com o padrão nistatina apresentou resultados satisfatórios inibindo todas as cepas, de modo que a menor concentração testada, de 0,008 mg/mL, ainda se mostrou eficaz.

Foram realizados testes para determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM), que é observada pela menor concentração do composto que não permite o crescimento de qualquer colônia de fungo no meio de cultura após subcultivo. Contudo, nas placas onde foram plaqueadas as alíquotas dos poços onde não apresentaram crescimento, visualizou-se o aparecimento de colônias das leveduras, concluindo que a CFM dos extratos brutos e frações é $> 5,0$ mg/mL (maior concentração testada).



Tabela 1 - Resultados dos testes de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em mg/mL dos extratos e frações das plantas da família Asteraceae..

Extratos e frações	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>
VC-EB	>5,0	5,0	5,0	5,0
VC-FHX	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0
VC-FDC	>5,0	>5,0	2,5	>5,0
VC-FAC	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0
VC-FHM	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0
VDI-EB	5,0	5,0	5,0	5,0
VDI-FHX	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0
VDI-FDC	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0
VDI-FAC	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0
VDI-FHM	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0
SL-FHX	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0
SL-FCHCl3	5,0	5,0	5,0	5,0
SL-FAC	5,0	5,0	5,0	5,0
SL-FBuOH	5,0	>5,0	>5,0	>5,0
SL-FHM	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0
AI-EB	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0
AI-FHX	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0
AI-FDC	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0
AI-FAC	5,0	2,5	5,0	2,5
AI-FHM	>5,0	>5,0	>5,0	>5,0
NISTATINA	<0,008	<0,008	<0,008	<0,008

Legenda: VC: *Vernonanthura cuneifolia*, VDI: *Vernonanthura discolor*, SL: *Stevia leptophylla*, AI: *Austroeupeatorium inulaefolium*, EB: extrato bruto, FHX: fração hexano, FDC: fração diclorometano, FAC: fração acetato de etila, FHM: fração hidrometanólica, FCHCl₃: fração clorofórmio, FbuOH: fração butanólica.

Fonte: Autoria própria (2021).

4 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos, conclui-se que as plantas *Vernonanthura cuneifolia* e *Stevia leptophylla* foram as mais eficientes contra leveduras utilizadas neste estudo, apresentando menores valores de CIM. Com isso, vemos a importância de se estudar novas plantas com o intuito de encontrar substâncias antifúngicas. Estudos adicionais devem ser realizados a fim de explorar as plantas da família Asteraceae com intuito de se obter substâncias com atividade contra fungos.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá pelo fornecimento dos extratos e frações das plantas para o desenvolvimento deste trabalho. À Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Toledo pelo apoio às pesquisas científicas.



SEI-SICITE 2021

Pesquisa e Extensão para um mundo em transformação

XI Seminário de Extensão e Inovação
XXVI Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica
08 a 12 de Novembro - Guarapuava/PR



REFERÊNCIAS

- BERETTA, M.E. et al. **A família Asteraceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil.** Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 6, n. 3, p. 189-216, jul./set. 2008.
- CASTRO, T.L. et al. **Mecanismos de resistência da Candida sp wwa antifúngicos.** Infarma, v. 18, n 9/10, p. 30-35, 2006.
- PIRES, I.F.B. et al. **Plantas medicinais como opção terapêutica em comunidade de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Campinas, v. 16, n. 2, supl. I, p. 426-433, 2014.
- ROQUE, N.; BAUTISTA, H. **Asteraceae caracterização e morfologia floral.** Salvador: EDUFBA, p.11-17, 2008.
- SOBREIRA, A.L.C. et al. **Atividade antifúngica do extrato etanólico de própolis vermelha contra isolados patogênicos de Candida spp.** Revista Verde, v.15, n.4, p.429-433, 2020.