

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO DE *CNIDOSCOLUS ACONITIFOLIUS* (MILL.) I.M. JOHNST. FRENTE A *CANDIDA ALBICANS* (C.P. ROBIN) BERKHOUT

EVALUATION OF THE ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *CNIDOSCOLUS ACONITIFOLIUS* EXTRACT AGAINST *CANDIDA ALBICANS*

Yara Rodrigues dos Santos¹, Rafaela Souza dos Santos¹, José Luiz Carneiro da Rocha², Ana Carolina Oliveira Santana³.

RESUMO

Objetivo: O presente artigo descreve os resultados obtidos a partir de testes realizados em extrato etanólico da *Cnidocolus aconitifolius* em cepas de *Candida albicans*. **Métodos:** O método utilizado foi o de Concentração Inibitória Mínima (CIM), realizado em triplicata em placa de 96 poços. A diluição contou com 100µL do extrato da *C. aconitifolius* mais 100µL da suspensão com turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland das colônias de *C. albicans*, em meio Ágar Muller Hinton. Posteriormente, poços foram selecionados para confirmação dos resultados por meio de semeadura em meios de cultura de Agar Sabouraud. **Resultados:** A análise desses meios confirmou presença dos fungos observado nos poços. Houve inibição do crescimento de 2mg/mL e 1mg/mL; nas demais concentrações advindas da microdiluição, não houve crescimento do fungo. **Conclusão:** Desta forma, considerando os resultados da inibição do crescimento fungo nas concentrações citadas, a pesquisa continuará a fim de investigar qual a margem de toxicidade e quais os metabólitos presentes no extrato.

Palavras-chave: Extrato etanólico, *Cnidocolus*, *Candida*.

ABSTRACT

Objective: This article describes the results obtained from tests performed on ethanolic extract of *Cnidocolus aconitifolius* on *Candida albicans* strains. **Methods:** The method used was the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), performed in triplicate in a 96-well plate. The dilution included 100µL of *C. aconitifolius* extract plus 100µL of the suspension with turbidity equivalent to the 0.5 tube of the McFarland scale of *C. albicans* colonies, in Muller Hinton Agar medium. Subsequently, wells were selected to confirm the results by sowing in Agar Sabouraud culture media. **Results:** The analysis of these media confirmed the presence of fungi observed in the wells. There was growth inhibition of 2mg/mL and 1mg/mL; in the other concentrations resulting from microdilution, there was no growth of the fungus. **Conclusion:** Thus, considering the results of the inhibition of fungi growth at the concentrations mentioned, the research will continue to investigate the toxicity margin and which metabolites are present in the extract.

Keywords: Ethanol extract, *Cnidocolus*, *Candida*.

1 Unidade de Ensino Superior de Feira de Santana.

2 Departamento de Farmácia, Unidade de Ensino Superior de Feira de Santana. Feira de Santana BA Brasil.

3 Departamento de Biomedicina, Unidade de Ensino Superior de Feira de Santana. Feira de Santana BA Brasil

INTRODUÇÃO

Infecções fúngicas se tornaram cada vez mais frequentes, segundo dados de 2016 do Ministério da Saúde, mais de 3,8 milhões de pessoas sofreram de alguma infecção fúngica grave. Os fungos não eram considerados agentes patológicos frequentes de risco à saúde humana; entretanto, nos presentes dias, as infecções fúngicas são consideradas a quinta maior causa de mortalidade mundial e podem deixar sequelas permanentes¹.

Um dos fungos mais incidentes é o gênero *Candida* spp. Os quadros de infecções são conhecidos como candidíase ou candidoses. Essa levedura possui a capacidade de formar biofilmes nas mucosas do indivíduo infectado e em alguns casos, esses fungos ainda apresentam resistência aos antifúngicos disponíveis.

Tratamentos alternativos têm ganhado força na comunidade científica por apresentarem um baixo nível de toxicidade, poucos efeitos colaterais e boa eficácia, destacando-se o uso de plantas medicinais². O conhecimento sobre a aplicabilidade das plantas sempre esteve presente nas civilizações, fazendo parte de uma prática passada por gerações, sendo, por vezes, o principal acesso a tratamentos.

A *Cnidoscopus aconitifolius* (Mill.) I.M.Johnst é uma planta medicinal que, assim como as outras do gênero *Cnidoscopus*, vem sendo testada para verificação de atividade antimicrobiana, demonstrando resultados positivos para além de sua capacidade nutracêutica e antiglicemiante, já conhecida em vários países, tais como o México. O interesse consiste na sua baixa toxicidade e grande eficácia³.

Diante da possibilidade da espécie *C. aconitifolius* ter um potencial antifúngico, este artigo teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica do extrato das folhas, dessa mesma planta, e determinar sua concentração mínima para inibir o crescimento do fungo *Candida albicans*.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo teve caráter experimental, qualitativo e quantitativo. As mudas de *Cnidoscopus aconitifolius* foram plantadas na cidade de Mundo Novo – BA (-11.857407, -40.467589) em novembro de 2020, adubadas com terra vegetal e cálcio, e mantidas por três meses em local sombreado e regadas em dias alternados. Posteriormente, as mudas foram transplantadas para o horto da Unidade de Ensino Superior de Feira de Santana (UNEF) (-12.275373, -38.933770) - BA, no dia 09 de fevereiro de 2021, receberam adubo com terra orgânica, sendo regadas diariamente no final da tarde. A coleta das folhas de três espécimes destinadas à realização dos experimentos ocorreu no mês de maio de 2021.

O material fresco foi encaminhado para o laboratório de Bioquímica da UNEF e seguiu o processo de maceração de cada espécime, identificadas com números de 1 a 3. O peso de material vegetal obtido para cada espécime foi, respectivamente, 50,56g, 43,02g e 50,53g. Todas foram submetidas à extração por maceração à frio em 1L de etanol P.A 96%.

Após o processo de extração, foi realizado o cultivo das colônias de *Candida albicans* obtidas de isolados de pacientes. Estas foram cultivadas em placas de petri contendo meio Ágar Muller Hinton e incubadas a 37°C por 24 horas em estufa microbiológica. Os testes foram realizados em triplicata, usando o extrato etanólico em diferentes concentrações, sendo elas: 2mg/mL, 1mg/mL, 0,5mg/mL, 0,25mg/mL, 0,625mg/mL e 0,3125mg/mL.

Para a preparação do inóculo foram escolhidas cinco colônias com diâmetro de aproximadamente 1mm, após incubação de 24 horas das amostras de *C. albicans*. As colônias foram suspensas em 5ml de solução salina estéril (0,85%) e a suspensão resultante foi homogeneizada em agitador de Vórtex, durante 15 segundos. Conseqüente, acrescentou-se solução salina suficiente para obter a turvação equivalente

ao tubo de número 0,5 da escala de McFarland, de modo a se obter uma suspensão-padrão de leveduras contendo aproximadamente $1,5 \times 10^6$ microrganismos/mL.

A diluição seriada foi feita utilizando tubo Eppendorf, sendo estes identificados pelas respectivas concentrações do extrato. Em seguida, foram utilizadas placas de microdiluição de 96 poços, conforme a Figura 1, onde as fileiras foram separadas e identificadas por concentração. A cultura de *Candida* foi pipetada em todos os poços, exceto na fileira correspondente ao controle negativo. Depois, com auxílio de uma pipeta automática, foram introduzidos, em cada poço, 100µL do extrato já diluído em diferentes concentrações. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas em estufa microbiológica e após este período foi observada a concentração mínima do extrato capaz de inibir o crescimento fúngico de *C. albicans*.

Em seguida, para confirmar o resultado encontrado após a incubação, foram selecionados alguns desses poços e semeados em placas de petri contendo meio Ágar Sabouraud. A utilização do Ágar Sabouraud é justificada pelo fato de se tratar de um meio de cultura seletivo para fungos, deste modo anularia a possibilidade de

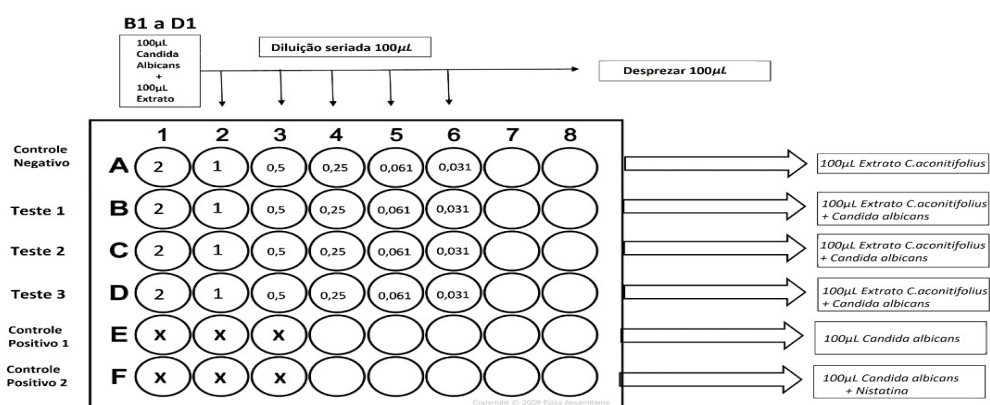
crescimento de outro microrganismo; para além disso Oliveira⁵ relatou que quando as colônias de *C. albicans* são cultivadas em meio Ágar Sabouraud a 37°C tem um crescimento considerável em 24 a 48h, e de forma macroscópica é possível notar colônias com aspectos opacas ou brilhantes, textura cremosa, coloração branca a creme, bordas regulares ou irregulares e odor de levedo.

Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas e após esse período foram feitas as leituras das placas para observação do crescimento de colônias. Os resultados obtidos no experimento foram lançados em forma de tabela.

RESULTADOS

Por meio do teste de microdiluição na placa de 96 poços, foi possível avaliar em quais concentrações o extrato da *Cnidioscolus aconitifolius* conseguiu inibir o crescimento das cepas de *Candida albicans*. Os dados foram computados em forma de Tabela (Tabela 1) onde é possível observar que nas concentrações de 2mg/mL e 1mg/mL houve inibição do crescimento fúngico.

Figura 1 – Placa de 96 poços disposta conforme o experimento de diluição seriada.



Controle negativo (A1, A2, A3, A4, A5, A6) com 100µL do extrato. Teste 1 (B1, B2, B3, B4, B5, B6), Teste 2 (C1, C2, C3, C4, C5, C6), Teste 3 (D1, D2, D3, D4, D5, D6) com 100µL do extrato mais 100µL da suspensão de *Candida albicans*. Controle Positivo 1 (E1, E2, E3) com 100µL de *C. albicans* e Controle Positivo 2 (F1, F2, F3) com 100µL de *C. albicans* + Nistatina 100.000UI/mL.

Tabela 1 - Resultados dos testes da atividade antifúngica do extrato de *Cnidoscopus aconitifolius* pela técnica de microdiluição sobre amostra padrão de *C. albicans*.

Volume (µL)	2	1	0,5	0,25	0,061	0,031
Controle negativo	-	-	-	-	-	-
Teste 1	-	-	+	+	+	+
Teste 2	-	-	+	+	+	+
Teste 3	-	-	+	+	+	+
Controle positivo	-	-	-	-	-	-

Nota: o símbolo (+) indica presença de colônia; o símbolo (-) indica ausência de colônia.

Os demais poços, visualmente, não demonstravam de forma fidedigna os possíveis resultados de inibição. Por este motivo, pelo menos um dos poços de cada triplicata foram selecionados para melhor avaliação em nova cultura em placas de petri para observação das colônias. Os resultados estão ilustrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Poços selecionados para semeadura em Ágar Sabouraud.

Amostra	Crescimento de colônia
Controle negativo	-
Teste 1: 2 µL	-
Teste 1: 1 µL	-
Teste 1: 0,5 µL	+
Teste 1: 0,25 µL	+
Teste 1: 0,061 µL	+
Teste 1: 0,031 µL	+
Controle positivo	-

A1 (Controle Negativo), (Teste 1) B1 (2mg/mL), B2 (1mg/mL), B3 (0,5mg/mL), B4 (0,25mg/mL), B5(0,061mg/mL), B6(0,031mg/ml), (Teste 3) D4 (0,5mg/mL), F1 (Controle Positivo). Nota: o símbolo (+) indica presença de colônia; o símbolo (-) indica ausência de colônia.

DISCUSSÃO

O resultado da análise das placas comprovara que nas concentrações de 2mg/ml e 1mg/ml, houve inibição fúngica; em contrapartida, nas placas referentes aos poços com menores concentrações, o extrato não apresentou inibição do crescimento.

Neste estudo experimental qualitativo e quantitativo in vitro, comprovou-se que nas maiores concentrações do extrato da *C. aconitifolius*, houve inibição do crescimento das colônias de *C. albicans*, abrindo uma oportunidade para um estudo mais aprofundado acerca de qual substância em sua forma isolada é responsável pela inibição do fungo.

O gênero *Cnidoscopus* já foi testado em outros estudos de verificação para sua atividade antimicrobiana, apresentando potencial de amplo espectro por seu extrato etanólico em cepas bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas, como descreve Souza⁶ em um estudo experimental através do método referente à CIM. Neste estudo, com a espécie *Cnidoscopus urens* (L.) foi constatada a presença de metabólitos secundários como taninos, cumarinas, lignanas, monoterpenos, diterpenos, esteróides e flavonóides e apresentou melhor ação bactericida nas fases EEB

(extrato etanólico bruto), hexânicas, Hex/AcEOt (hexânica/acetato de etila 1:1) e AcEOt (acetato de etila).

Em outro estudo realizado por Araújo⁷, utilizando o método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Coluna de Fase Reversa (CLAE-FR), a fim de verificar a atividade antibacteriana e citotóxica in vitro de frações purificadas da planta *Cnidoscopus urens*, foi comprovado que no crescimento das colônias bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, apresentaram-se halos de inibição, evidenciando que o extrato etanólico da *C. urens* confere atividade antibacteriana na concentração de 10mg/poço, apresentando halos de inibição de 10mm.

Alguns estudos realizados acerca das possíveis atividades antifúngicas da *C. aconitifolius*, diversos metabólitos foram encontrados a partir das análises em diferentes extratos. Hamid et al.⁸ em seus resultados revelou a presença de flavonóides, terpenos e glicosídeos nos extratos de metanol, n-hexano e acetato de etila. Ambos os metabólitos, possuem atividades antibacterianas, antifúngicas e anti-inflamatórias. Os testes foram realizados em caldo ágar Sabouraud dextrose com oito poços, o resultado apontou zonas de inibição de quatro isolados frescos de fungos *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolon* e *Penicillium notatum* nos extratos citados, sendo que no extrato de acetato de etila não houve atividade antifúngica em *Rhizopus stolonifer*; entretanto, no extrato de n-hexano, apresentou alta atividade antifúngica frente ao demais fungos em concentrações variando de 12, 5 a 200mg/mL assim como no extrato de metanol, variando apenas a concentração que variou de 50 a 200mg/mL.

A busca pelo desenvolvimento de novos antifúngicos é fortalecida com resultados deste estudo, com a justificativa de: (i) poder reduzir o tempo de tratamento de pacientes quando se é administrado o tratamento específico, uma vez que, conhecendo a causalidade da doença, há a

disponibilidade de um fármaco eficiente para tratá-la; (ii) existir pouca classe de antifúngicos, aspecto que dificulta o processo quando se encontra diante da possibilidade de resistência, ou seja, um novo fármaco pode ter o potencial alternativo terapêutico diante desta ameaça. Vale salientar que apesar da constatação da existência de atividade antifúngica contra *C. albicans*, será necessário um aprofundamento nos estudos para que o extrato possa vir a se tornar um novo agente antifúngico.

CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos, podemos concluir que o extrato etanólico das folhas de *Cnidoscopus aconitifolius* é capaz de inibir o crescimento de *Candida albicans*, quando utilizado nas concentrações de 2mg e 1mg.

Estes resultados encaminham os estudos para uma investigação mais aprofundada dos compostos responsáveis por esta inibição, através de estudos biomonitorados, a fim de se definir os metabólitos responsáveis por tais atividades. Fica comprovado que, além de suas atividades conhecidas no meio científico, esta planta também possui propriedades inibitórias para o fungo *C. albicans*, sendo um promissor tratamento para infecções fúngicas causadas por essa espécie.

Como já citado anteriormente, as espécies de *Candida* manifestam-se cada vez mais resistentes aos antifúngicos já disponíveis no mercado, desta forma, a terapia por meio de plantas medicinais se torna uma opção promissora, salientando que é preciso investigar se essas concentrações são seguras e qual a melhor forma de administração; além disto, a utilização dela enquanto planta ou a possibilidade de um composto sintético advindo dela.

REFERÊNCIAS

1. Morosini L. Avanços dos Fungos. RADRIS Comunicação e Saúde. Manguinhos – Rio de Janeiro – RJ. Disponível em: <
<https://radis.ensp.fiocruz.br/index.php/home/reportagem/avanco-dos-fungos#g-footer>>
 Acesso em 26 set. 2020.

2. Szerwieski DLL et al. Uso de Plantas Medicinais por Idosos da Atenção Primária. Revista UFG. 2017.

3. Soto VR et al. *Cnidoscopus chayamansa* Hidropónica Orgánica y Su Capacidad Hipoglucemiante, Calidad Nutraceutica y Toxicidad. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas.2015;6(4):815-825.

4. Nobile JC, Johnson DA. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. Annu Rev Microbiol.2016.

5. Oliveira LA, Cortez ACA, Souza JVB. Identificação de espécies do gênero *Candida* Mantidas na Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA. Diversidade Microbiana da Amazônia 2015.

6. Souza AJ. Estudo Fitoquímico e Atividade Biológica In Vitro de *Cnidoscopus urens* L. (Arthur) (EUPHORBIACEAE). Petrolina, PE, 2014.

7. Araújo LMM. Avaliação das Atividades Antibióticas e Antiproliferativa Tumoral das Frações Purificadas da Urtiga *Cnidoscopus urens*. Universidade Federal de Campina Grande. Centro de desenvolvimento sustentável do semiárido. Unidade Acadêmica de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos. Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos. Sumé - Paraíba - PB. 2018.

8. Hamid AA et al.. Chemical Contituents, Antibacterial, Antifungal and Antioxidant Activities of The Aerial Parts of *Cnidoscopus aconitifolius*. Iffe Journal of Science.2016;18(2).