

**COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS
ETANÓLICO E AQUOSO DE *RHAPHIODON ECHINUS* (LAMIACEAE)
CONTRA CEPAS DE *CANDIDA ALBICANS***

COMPARATION OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF ETHANOLIC AND
AQUEOUS EXTRACTS OF *RHAPHIODON ECHINUS* (LAMIACEAE) AGAINST
CANDIDA ALBICANS STRAINS

JOSÉ LUCAS SOARES **FERREIRA**. Acadêmico do curso de graduação do curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande.

DANIELE DE SOUZA **SIQUEIRA**. Acadêmica do curso de graduação do curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande.

LETÍCIA ATAÍDE **DELGADO**. Acadêmica do curso de graduação do curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande.

JOYCE NATIELLE MIRANDA **CAVALCANTE**. Acadêmica do curso de graduação do curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande.

REBECA CÍCERA MENDES DE OLIVEIRA **SILVA**. Acadêmica do curso de graduação do curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande.

RAFAEL CARTAXO **FILGUEIRA**. Acadêmico do curso de graduação do curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande.

RAQUEL VIEIRA **BEZERRA**. Acadêmica do curso de graduação do curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande.

HELOISA MARA BATISTA FERNANDES DE **OLIVEIRA**. Farmacêutica-Bioquímica do Hospital Universitário Ana Bezerra da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

GABRIELA LEMOS DE AZEVEDO **MAIA**. Professora Doutora da Universidade Federal do vale do São Francisco.

EDELTRUDES DE OLIVEIRA **LIMA**. Professora Doutora da Universidade Federal da Paraíba.

ABRAHÃO ALVES DE **OLIVEIRA FILHO**. Professor Doutor da Universidade Federal de Campina Grande.

Estrada Patos – Teixeira, Jatobá, Patos-PA, CEP 58700-970. E-mail: abrahao.farm@gmail.com

RESUMO

Indivíduos saudáveis podem apresentar alguns dos gêneros da *Cândida* na cavidade oral, porém cerca de oito espécies podem desencadear a candidíase

oral e uma delas é a *Candida albicans*, uma das mais patogênicas e de maior importância odontológica. A candidíase é causada por leveduras, essa micose apresenta um espectro clínico bem variável, podendo se comportar como uma lesão branda, aguda ou crônica. O uso indiscriminado de antifúngicos disponíveis é o principal responsável pela resistência fúngica. Dessa forma, houve a necessidade de inovar a área farmacológica através das pesquisas por medicamentos de origem natural ou sintética que vêm sendo uma alternativa eficaz e econômica. Esse trabalho procura analisar a possível atividade antifúngica dos extratos etanólico e aquoso de *Rhaphiodon echinus* (*Lamiaceae*), espécie vegetal presente no Nordeste brasileiro, contra cepas de *Candida albicans*. Desta forma, o presente trabalho objetivou analisar a atividade antifúngica dos extratos etanólico e aquoso de *Rhaphiodon echinus* sobre cepas de *Candida albicans* (ATCC 76645, LM 106, LM 108 e LM 111), obtendo a Concentração Inibitória Mínima (CIM) por meio de ensaios *in vitro* utilizando a técnica de microdiluição em caldo. A CIM_{50%} do extrato aquoso de *Rhaphiodon echinus* contra as cepas de *Candida albicans* foi de 256 µg/mL. A CIM_{50%} do extrato etanólico de *Rhaphiodon echinus* contra as cepas de *Candida albicans* foi de 256 µg/mL, tendo assim o mesmo efeito quando comparadas. Conclui-se que os extratos de *Rhaphiodon echinus* são eficazes contra as cepas de *C. albicans*.

PALAVRAS-CHAVE: *Candida Albicans. Rhaphiodon Echinus.* Plantas Medicinais.

ABSTRACT

Healthy individuals may present some of the genera of *Candida* in the oral cavity, but about eight species may trigger oral candidiasis and one of them is *Candida albicans*, one of the most pathogenic and of major dental importance. Candidiasis is caused by yeast, this mycosis has a very variable clinical spectrum and may behave as a mild, acute or chronic lesion. The indiscriminate use of available antifungal agents is primarily responsible for fungal resistance. Thus, there was a need to innovate the pharmacological area through research on drugs of natural or synthetic origin that have been an effective and economical alternative. This work aims to analyze the possible antifungal activity of ethanolic and aqueous extracts of *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (*Lamiaceae*), a plant species present in the Brazilian Northeast, against strains of *Candida albicans*. Thus, the present work aimed to analyze the antifungal activity of ethanolic and aqueous extracts of *Rhaphiodon echinus* on strains of *Candida albicans* (ATCC 76645, LM 106, LM 108 and LM 111), obtaining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by means of assays *in vitro* using broth microdilution technique. CIM 50% of the aqueous extract of *Rhaphiodon echinus* against *Candida albicans* strains was 256 µg / mL. The CIM50% of the ethanolic extract of *Rhaphiodon echinus* against the strains of *Candida albicans* was 256 µg / mL, thus having the same effect when compared. It is concluded that extracts of *Rhaphiodon echinus* are effective against strains of *C. albicans*

KEYWORDS: *Candida Albicans. Rhaphiodon Echinus.* Medicinal Plants.

INTRODUÇÃO

A cavidade oral é colonizada por uma comunidade de microrganismos que constituem a microbiota residente, composta principalmente por bactérias e fungos. Conta-se hoje com mais de 700 espécies de microrganismos identificados, onde há evidências demonstrando que a microbiota pode exercer efeitos positivos e negativos sobre a saúde do hospedeiro, formando um ecossistema complexo, cujas consequências disso sobre o indivíduo serão variáveis e dependerão de fatores que influenciam o equilíbrio dinâmico entre microrganismos e hospedeiro (MAGALHÃES et al., 2005).

Candidíase ou candidose é uma micose causada por leveduras do gênero *Candida*, em que a lesão pode ser branda, aguda ou crônica, superficial ou profunda, e de espectro clínico bem variável (FREIRE et al., 2016)

O gênero *Cândida* é composto por fungos leveduriformes hialinos, com formação de blastoconídios, pseudo-hifas e, ocasionalmente, hifas verdadeiras. Macroscopicamente, em culturas de ágar Sabouraud destrose, as colônias são geralmente de cor creme ou esbranquiçada e a textura pode ser lisa ou enrugada, brilhante ou seca (LACAZ et al., 2002; SILVA et al., 2012).

Segundo Pfaller e Diekema (2007), mais de 17 espécies diferentes do gênero *Candida* são conhecidas como agentes etiológicos de infecções em humanos, entretanto mais de 90% das infecções invasivas são causadas por *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*.

Entre as espécies pertencentes ao gênero *Candida*, a *Candida albicans* é considerada como uma das mais patogênicas, bem como a espécie de maior importância odontológica, sendo que sua ocorrência neste sítio anatômico representa 20% a 60% de todos os isolados. Assim, apresenta-se como um dos agentes patógenos mais importantes encontrados na cavidade oral (HERNÁNDEZSOLÍS et al., 2014).

A candidose bucal pode afetar a qualidade de vida e dificultar a alimentação devido à presença de sangramento, exsudação, sensação de queimação, dor, halitose, gosto desagradável e secura da boca (ARENDORF et al., 1987). Além disso, a infecção por *Candida* spp. é de difícil controle, devido à sua natureza multifatorial e ao pequeno número de drogas disponíveis para seu tratamento (BATISTA et al., 1999).

Além de diversas formas de candidose, essas leveduras podem estar envolvidas em lesões endodônticas persistentes e doenças periodontais (SUNDQVIST et al., 1998). Waltimo et al. (1997) afirmaram que leveduras, especialmente *C. albicans*, são resistentes ao tratamento convencional em 7% dos casos de lesão periapical, tornando-se importante a investigação de produtos naturais contra *Candida* que possam ser utilizados.

Vários Medicamentos antifúngicos vêm sendo desenvolvidos para o tratamento da candida bucal, como os antissépticos à base de tintura de iodo, iodoquinol, violeta de genciana, ácido salicílico e benzoico, derivados sulfamídicos, corantes, quinonas e antifúngicos poliênicos (nistatina, anfotericina B). Além desses também temos os antifúngicos azóis que são: agentes do imidazol (cetoconazol, clotrimazol) e os agentes triazóis (fluconazol e Itraconazol)(ARAÚJO et al., 2004; NEVILLE et al., 2015). Porém, as infecções fúngicas são de difícil tratamento, fato relacionado à elevada resistência da *Candida* frente à ação de alguns antifúngicos convencionais (ARAÚJO et al., 2004; VANDEPUTTE et al., 2012).

O uso excessivo e indiscriminado destes fármacos propicia o surgimento de leveduras resistentes, principalmente em pacientes imunossuprimidos, susceptíveis a infecções frequentes. Assim, há necessidade do desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas de maior eficácia, dentre as possibilidades, surge a utilização de fitoterápicos a base de plantas medicinais como tratamento alternativo. Os mesmos se diferem por apresentar uma diversidade molecular superior aos sintéticos, proporcionando novas descobertas, com pesquisa nas atividades biológicas que podem favorecer na prevenção e tratamento de doenças (ANDRADE et al., 2012).

As plantas com propriedades terapêuticas para o cuidado da saúde são utilizadas desde a antiguidade até os dias atuais, e vêm constituindo uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos que contém uma série de substâncias que podem ser utilizadas para os tratamentos de diferentes doenças infecciosas. Elas aparecem como parte do cuidado tradicional de saúde em muitas partes do mundo e têm despertado o interesse de vários pesquisadores. (ANDRADE et al., 2010)

A utilização de plantas medicinais com finalidade terapêutica é de origem popular, entretanto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) incentivou o estudo científico dessas plantas a partir dos anos setenta, objetivando o conhecimento dos benefícios desses agentes medicinais e os riscos quando consumidos de forma exagerada. Diversos fatores têm colaborado com o desenvolvimento de práticas de saúde que incluam plantas medicinais, principalmente baixo custo e fácil manuseio (ALMEIDA; MENEZES, 2002).

Entre os óleos essenciais encontrados no Brasil destaca-se o óleo oriundo da planta *Rhaphiodon echinus*, uma espécie vegetal encontrada na Caatinga, pertencente à família da Lamiaceae e conhecida popularmente como flor-de-urubu. Na medicina tradicional a infusão da planta é usada no tratamento da tosse e inflamação na cavidade oral, porém o extrato aquoso desta planta demonstrou atividade anti-inflamatória e também analgésica. (MENEZES et al., 1998; TORRES et al., 2009).

Desta forma, com base nas informações sobre o potencial terapêutico das plantas medicinais e a importância do combate as infecções causadas por leveduras do gênero *Candida*, esse trabalho procura avaliar a possível atividade antifúngica dos extratos etanólico e aquoso de *Rhaphiodon echinus* (Lamiaceae) contra cepas de *Candida albicans*.

METODOLOGIA

Ensaio *in vitro*

Substância-teste

Para os ensaios deste relatório parcial foram utilizados os extratos aquoso e etanólico das partes aéreas de *Rhaphiodon echinus*, que foram cedidos pela equipe da Prof^ª. Dr^ª. Gabriela Lemos de Azevedo Maia, da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF).

Os extratos foram conservados em frasco de vidro âmbar e mantidos sob refrigeração. As emulsões dos extratos nas diferentes concentrações foram preparadas no momento de execução dos ensaios e através de diluições em água destilada ou no próprio meio de cultura foram obtidas as concentrações

desejadas de ambos os extratos.

Espécies Fúngicas

Foram utilizadas quatro cepas de *Candida albicans*, uma padrão e três clínicas: ATCC 76645, LM 106, LM 108 e LM 111), previamente isoladas, identificadas e gentilmente cedidas pelo Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, sob a direção da Prof^a. Dr^a Edeltrudes de Oliveira Lima.

Todas as cepas foram mantidas em ágar Sabouraud dextrose (ASD) a uma temperatura de 4°C, sendo utilizados para os ensaios repiques de 24 horas em ASD incubados a 35 °C. No estudo da atividade antimicrobiana foi utilizado um inóculo fúngico de aproximadamente $\times 10^6$ UFC/mL padronizado de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK, GREGER, 2000).

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As Concentrações inibitórias mínimas dos extratos aquoso e etanólico de *Raphiodon echinus* foram determinadas pela técnica de microdiluição em caldo (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK, GREGER, 2000). Foram utilizadas placas de 96 orifícios estéreis e com tampa. Em cada orifício da placa, foi adicionado 100 µL do meio líquido caldo Sabouraud dextrose duplamente concentrado. Em seguida, 100 µL da emulsão do extrato na concentração inicial de 2048 µg/mL (também duplamente concentrado), foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada em razão de dois, foram obtidas as concentrações de 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 e 4 µg/mL, de modo que na primeira linha da placa encontra-se a maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim, foi adicionado 10 µL do inóculo de aproximadamente 10^6 UFC/mL das espécies fúngicas nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica, especificamente. Paralelamente, foi realizado o mesmo ensaio com o antifúngico nistatina.

Um controle de micro-organismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100 µL do mesmo CSD duplamente concentrado, 100 µL de água destilada estéril e 10 µL do inóculo de cada espécie. Para verificar a ausência de interferência nos resultados pelos solventes utilizados na preparação da emulsão, no caso o DMSO (dimetilsulfóxido) e o Tween 80, foi feito um controle no qual foram colocados nas cavidades 100 µL do caldo duplamente concentrado, 50 µL de DMSO (5%), 50 µL de Tween 80 (2%) e 10µL da suspensão fúngica. Um controle de esterilidade do meio também foi realizado, onde foi colocado 200 µL do CSD em um orifício sem a suspensão dos fungos.

As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a 35°C por 24 - 48 hs para ser realizada a leitura. A CIM para os extratos e antifúngico foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico verificado nos orifícios quando comparado com o crescimento controle. Os experimentos foram realizados em duplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é referida como a menor concentração de uma substância teste capaz de inibir o crescimento microbiano de maneira visível. Os dados obtidos estão presentes na tabela abaixo. A CIM₅₀ é dita como a menor concentração capaz de inibir 50% das cepas durante o experimento; seguindo a premissa, observa-se que a CIM₅₀ para *Candida albicans* foi de 256 µg/mL para ambos os extratos.

Tabela 1- Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL do extrato aquoso de *Rhaphiodon echinus* contra cepas de *Candida albicans*.

| CEPA FÚNGICA | CIM |
|-------------------|------------|
| ATCC 76645 | 1024 µg/mL |
| LM 106 | 256 µg/mL |
| LM 108 | 256 µg/mL |
| LM 111 | 512 µg/mL |
| Controle positivo | + |
| Controle negativo | - |

(-) = não houve inibição visível da cepa

(+) = inibição visível da cepa

Fonte: o autor.

Segundo Sartoratto et al. (2004), o potencial antifúngico é dito forte quando a CIM atinge valores inferiores a 500 µg/mL, moderado entre 600 µg/mL – 1500 µg/mL e considerado fraco quando os valores da CIM ultrapassarem 1500 µg/mL. O extrato aquoso de *Rhaphiodon echinus* demonstrou forte atividade antifúngica sobre as cepas de *Candida albicans* visto que obteve CIM₅₀ inferiores a 500 µg/mL.

Tabela 2- Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL do extrato etanólico de *Rhaphiodon echinus* contra cepas de *Candida albicans*.

| CEPA FÚNGICA | CIM |
|-------------------|------------|
| ATCC 76645 | 1024 µg/mL |
| LM 106 | 256 µg/mL |
| LM 108 | 256 µg/mL |
| LM 111 | 128 µg/mL |
| Controle positivo | + |
| Controle negativo | - |

(-) = não houve inibição visível da cepa

(+) = inibição visível da cepa

Fonte: o autor.

Comparando os resultados obtidos após os experimentos, observa-se que os extratos apresentaram o mesmo efeito contra as cepas, tendo uma CIM_{50%} de 256 µg/mL.

Kremer et al. (2013) avaliou as propriedades antifúngicas dos extratos etanólicos das folhas de *Teucrium arduini* L. (*lamiaceae*) contra cepas de

Candida albicans. Os resultados sugeriram susceptibilidade de *Candida albicans* contra os extratos etanólico de *Teucrium arduini* L. (*Lamiaceae*).

Salaris et al. (2016) avaliou as propriedades antifúngicas dos extratos metanólicos de *Salvia rhytidea* Benth (*Lamiaceae*) contra cepas de *Candida albicans*, *parapsilosis*, *glabrata*, *tropicalis*, *lusitaniae*, *krusei* e *guilliermondii*, utilizando um método de microdiluição em caldo. Os resultados revelaram que os isolados de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* foram mais susceptíveis aos extratos metanólicos de *Salvia rhytidea* Benth (*Lamiaceae*).

Costa et al. (2017) verificaram o efeito modulador dos extratos de *R. echinus* contra cepas de diferentes espécies de *Candida*, quando associados a antifúngicos sintéticos.

CONCLUSÃO

Diante do que foi exposto se observa o grande potencial e eficácia do extrato aquoso e etanólico da planta *Rhaphiodon Echinus* na ação antifúngica sobre a *Candida albicans*, pode ser considerado um recurso promissor para o tratamento de muitas enfermidades. No entanto, ainda existem poucos estudos nessa área, o que revela a necessidade de se intensificar mais estudos sobre o assunto.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, E. C.; MENEZES, H. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 8, n. 2, p. 191-212, 2002.

ANDRADE, M.A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista de Ciências Agrônômica**, v.43, n.2, p.399-408, 2012.

ARAÚJO, J.C.L.V. et al. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microorganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista Patologia Tropical**, v. 33, p. 55-64, 2004.

ARENDORF, T. M.; WALKER, D. M. Denture stomatitis: a review. **Journal of oral rehabilitation**, v. 14, n. 3, p. 217-227, 1987.

BARCELOS, F. F. et al. Estudo químico e da atividade biológica cardiovascular do óleo essencial de folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Burt & RM Sm. em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 1, p. 48-56, 2010.

BATISTA, J. M.; BIRMAN, E. G.; CURY, A. E. Suscetibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v. 13, n. 4, p. 343-348, 1999.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. New York: Willians & Wilkins, p. 739-788, 1991.

COSTA, A. R. et al. *Raphiodon echinus* (Ness & Mart.) Schauer: Chemical, toxicological activity and increased antibiotic activity of antifungal drug activity and antibacterial. **Microbial Pathogenesis**, v.107, p.280-286, 2017.

FREIRE, J.C. et al. Atividade antifúngica de fitoterápicos sobre espécies de *Candida*: uma revisão de literatura. **Archives of Health Investigation**, v. 5, n.6, p. 307-310, 2016.

HERNÁNDEZ-SOLÍS, S. E.; RUEDA-GORDILLO, F.; ROJAS-HERRERA, R. A. Actividad de la proteinasa en cepas de *Candida albicans* aisladas de la cavidad oral de pacientes inmunodeprimidos, con candidiasis oral y sujetos sanos. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.31, n. 2, p. 137-140, 2014.

KREMER, D. et al. Investigation of chemical compounds, antioxidant and antimicrobial properties of *Teucrium arduini* L. (Lamiaceae). **Current drug targets**, v. 14, n. 9, p. 1006-1014, 2013.

LACAZ, C. S. et al. Tratado de Micología Médica. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.44, n.5, 2002.

MENEZES, F. S. et al. Phytochemical and pharmacological studies on *Raphiodon echinus*. **Fitoterapia**, v. 69, n. 5, p. 459-460, 1998.

MOURÃO, P. et al. **Microbiota indígena de seres humanos**. 2005.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Review**, v 20, n. 1, p.133-63, 2007.

SALARI, S. et al. Evaluation of antifungal activity of standardized extract of *Salvia rhytidea* Benth (Lamiaceae) against various *Candida* isolates. **Journal de mycologie medicale**, v. 26, n. 4, p. 323-330, 2016.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Braz. J. Microbiol.** 2004; 35: 275 – 280.

SUNDQVIST, G. et al. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 85, n. 1, p. 86-93, 1998.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1-26, 2012.

WALTIMO, T. M.T. et al. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. **International Endodontic Journal**, v. 30, n. 2, p. 96-101, 1997.