

Ruta graveolens, *Pelargonium graveolens* E *Hibiscus cannabinus* COMO INIBIDORES NATURAIS DO CRESCIMENTO DE *Candida albicans*

Ruta graveolens, *Pelargonium graveolens* AND *Hibiscus cannabinus* AS NATURAL INHIBITORS OF GROWTH OF *Candida albicans*

Camila Mara dos Reis , Letícia Maria Soares Azevedo , Marisa Cristina da Fonseca Casteluber *

Universidade do Estado de Minas Gerais – Unidade Ibirité, Ibirité, MG, Brasil.

* marisa.casteluber@uemg.br

RESUMO

A candidíase é uma infecção causada por fungos do gênero *Candida*, sendo *Candida albicans* a espécie que mais causa a doença no Brasil. O Fluconazol é um antifúngico utilizado para o tratamento dessas infecções, porém, causa muitas reações adversas no paciente e o uso contínuo pode favorecer a resistência do patógeno. As plantas medicinais podem ser muito eficientes no tratamento alternativo de doenças e têm sido utilizadas na medicina popular há anos. Nesse estudo, foi avaliado *in vitro* a atividade antifúngica dos extratos de *Ruta graveolens*, *Pelargonium graveolens* e *Hibiscus cannabinus* contra o crescimento de *Candida albicans*, comparando a eficácia desses extratos vegetais com fluconazol. Os extratos foram preparados na concentração de 1g da planta para cada 5 mL de álcool 70%. Os dados foram obtidos através de difusão em ágar, e posteriormente foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de microdiluição em caldo. Os resultados mostraram que *R. graveolens* é eficaz na inibição de *C. albicans* com CIM de 100mg.mL⁻¹, quando comparado ao tratado com fluconazol. Os extratos de *P. graveolens* e *H. cannabinus* foram capazes de inibir a propagação fúngica de *C. albicans*, porém de forma menos eficiente quando comparados aos medicamentos comumente usados no tratamento. Desse modo, os resultados sugerem que o extrato de *R. graveolens* possa ser testado em futuros estudos *in vivo*, a fim de propor sua utilização em tratamento alternativo ou simultâneo com fármacos já utilizados.

Palavras-chave: Antifúngico. Candidíase. Plantas medicinais. Resistência fúngica.

ABSTRACT

Candidiasis is an infection caused by fungi of the genus *Candida*, *Candida albicans* being the species that most causes the disease in Brazil. The Fluconazole is the conventional medicine used as a treatment of these infections; however, it causes many adverse reactions in the patient and its continued use can induce the resistance of the pathogen. The medicinal plants can be very effective as an alternative treatment of diseases and have been used in folk medicine for years. In this study, it was evaluated the antifungal activity of extracts of *Ruta graveolens*, *Pelargonium graveolens* and *Hibiscus cannabinus* against the fungal development of *Candida albicans*, comparing the efficiency of these extracts to Fluconazole. The extracts were prepared in the concentration of 1g of the plant for each 5 mL of alcohol 70%. The data were obtained using the agar diffusion method. The minimum inhibitory concentration test (MIC) was performed, and showed that *R. graveolens* was able of inhibiting 100% of the pathogen when using 100 mg.ml⁻¹ concentration. From the results obtained, it was possible to conclude that *R. graveolens* was the most effective extract when compared to Fluconazole, suggesting that this extract can be used as an alternative to conventional treatment to improve the efficiency of current treatments. The extracts of *P. graveolens* and *H. cannabinus* also presented antifungal activity but in smaller proportion than Fluconazole. The data from this study suggests that *R. graveolens* extract can be tested in future *in vivo* studies with the objective of proposing its use in alternative or simultaneous treatment of the synthetic drug used.

Keywords: Antifungal. Candidiasis. Fungal resistance. Medicinal plants.

INTRODUÇÃO

A candidíase é uma doença causada por fungos do gênero *Candida*. Esse gênero abrange 200 espécies, sendo aproximadamente 20 delas patogênicas. É uma levedura natural do organismo humano e pode colonizar a pele e os tratos gastrointestinal, vaginal, bucal e urinário (SILVA, 2011).

A presença desse fungo na microbiota humana é natural, no entanto, quando há um desequilíbrio no sistema imunológico do hospedeiro, as espécies do gênero *Candida* podem se manifestar de forma agressiva. As micoses ocasionadas por esse gênero podem se apresentar de diferentes formas clínicas, em que a lesão pode ser branda, aguda ou crônica, superficial ou profunda (BARROS, 2017).

No Brasil, as infecções fúngicas causadas pelo gênero *Candida* (MAGALHÃES *et al.*, 2019) correspondem a 80%. Cerca de 30% das mulheres apresentam colonização por *Candida* vaginal. Já em 80% da população adulta saudável é encontrada *Candida* spp. no trato gastrointestinal. Pesquisas feitas no Brasil indica que 60% dos isolados clínicos inclui a espécie *Candida albicans*, sendo, assim, o maior agente de candidíase no país (BARBEDO, 2010).

Em decorrência da prevalência da candidíase nos últimos anos, os estudos sobre antifúngicos que visam a amenizar os casos da doença têm aumentado. Atualmente, os fármacos mais utilizados contra a candidíase são os triazólicos, como o fluconazol e o itraconazol (VIEIRA *et al.*, 2017). Contudo o uso indiscriminado de medicamentos como esses pode favorecer a resistência fúngica aos principais recursos terapêuticos utilizados para essa infecção (MAGALHÃES, 2019). Isso faz com que haja um aumento na taxa de ineficácia de seu tratamento assim como a morbidade e mortalidade causadas pela candidíase (VANDEPUTTE *et al.*, 2005).

Deste modo, é necessário que sejam desenvolvidos recursos capazes de controlar ou impedir que haja uma multirresistência aos antifúngicos, como já ocorreu com a multirresistência bacteriana aos antibióticos (FERREIRA, 2019). As plantas medicinais apresentam como alternativas eficazes para o tratamento de doenças na medicina popular, além de fornecerem matéria prima principal para síntese de drogas (BARROS, 2017).

O uso de plantas medicinais em tratamento de doenças é um costume antigo que vem despertando o interesse no âmbito científico, tornando alto o número de pesquisas na área (CORRÊA, 2017). Segundo Oliveira (2016), os óleos essenciais e extratos vegetais contêm compostos capazes de inibir e impedir o desenvolvimento de alguns patógenos. A utilização desses produtos como tratamento de algumas doenças pode aumentar a imunidade assim como diminuir os efeitos colaterais causados por tratamentos convencionais.

Tendo em vista o potencial antifúngico de *Ruta graveolens*, *Pelargonium graveolens* e *Hibiscus cannabinus*, o presente estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* o potencial inibitório dos extratos naturais dessas plantas contra o crescimento de *C. albicans*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade do Estado de Minas Gerais – Unidade Ibirité (LAMAP).

A levedura utilizada pertence à coleção de microrganismos do LAMAP – UEMG Ibirité. A cepa de *C. albicans* foi descongelada e cultivada em ágar Sabouraud Dextrose 2% (v/v), pH 4,0 em placa de Petri. As placas com o cultivo foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, foram armazenadas em geladeira sendo repicadas novamente a cada dez dias para manutenção do microrganismo.

Os extratos naturais foram obtidos através da maceração das folhas, caules e flores de: *Ruta graveolens*, *Pelargonium graveolens* e *Hibiscus cannabinus*, onde formaram três grupos distintos respectivamente; Grupo A, Grupo G e Grupo H. Para este processo, foram utilizados os métodos propostos pela Farmacopeia Brasileira (2010) com modificações, utilizando-se a proporção de 1g da planta para cada 5 mL de álcool 70% (v/v).

Os materiais vegetais foram lavados com água corrente e seco em temperatura ambiente, posteriormente foram cortados e macerados com o auxílio de pistilo, pela adição do álcool 70% (v/v) de forma gradativa. O extrato juntamente com o resíduo vegetal foi armazenado em frasco âmbar de tampa rosqueável em temperatura ambiente durante 15 dias, sendo agitado manualmente diariamente. Após 15 dias, o produto final foi obtido por filtração utilizando filtro de papel e funil. Os extratos obtidos foram colocados em frascos âmbar e armazenados em geladeira a 4 °C para uso posterior.

Os testes de disco de difusão em ágar foram realizados seis vezes em triplicata. O microrganismo foi inoculado na placa de Petri pela técnica de espalhamento e com auxílio de pipeta e ponteiros estéreis, na proporção de 1×10^6 células. mL^{-1} em placa contendo Ágar Mueller Hinton, preparado a partir de composto desidratado de acordo com as recomendações do fabricante, com pH 7,2 (CARVALHO, 2016). Em seguida, foram dispostos sobre o microrganismo recém inoculado, discos de papel filtro estéreis de 0,6 mm de diâmetro, embebidos com os extratos dos grupos testados, sendo eles: Grupo A (Arruda), G (Gerânio) e H (Hibisco), preparados conforme metodologia acima descrita; ambos na concentração 0,2 g/mL. Foram realizados testes utilizando também fluconazol ($150 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), o qual é um medicamento indicado para tratamento da candidíase (CANNON *et al.*, 2007), bem como testes com álcool 70% (v/v), diluente usado para o preparo dos extratos.

Após esses procedimentos, as placas foram incubadas em estufa micológica a 37 °C durante 12 horas. Posteriormente a esse período foi medido os halos de inibição com auxílio de paquímetro. Os dados foram avaliados por análise estatística comparando os resultados com os controles. A análise estatística foi feita utilizando-se a ferramenta Two-Way Anova pelo programa Graph Pad Prism 5.0. Foi realizada a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) dos dados obtidos.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada em duplicata a partir da metodologia descrita por Carvalho (2016) com alterações. Utilizou-se o método de microdiluição em microplacas de 96 poços. Os testes foram feitos em duplicata para cada extrato: Arruda (A), Gerânio (G) e Hibisco (H).

Para cada extrato foi realizado uma diluição seriada dos extratos, em caldo Mueller Hinton (LABORCLIN, 2019), obtendo-se as seguintes concentrações de extrato: $200 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $100 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $50 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $25 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $12,5 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $6,25 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $3,125 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $1,5625 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Figura 1). Após a diluição, foram adicionados 100 μL de suspensão de 1×10^6 células. mL^{-1} de *C. albicans* em cada uma dessas diluições. Foi utilizado também fluconazol na concentração de $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ e 100 μL de álcool 70% (v/v) por poço. Para análise dos dados, foi utilizado o programa Excel.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos de *Ruta graveolens*, *Pelargonium graveolens* e *Hibiscus cannabinus*, foram eficazes para inibir o crescimento fúngico de *C. albicans*, sendo que os três apresentaram halos de inibição no teste de difusão em ágar (Figura 1).

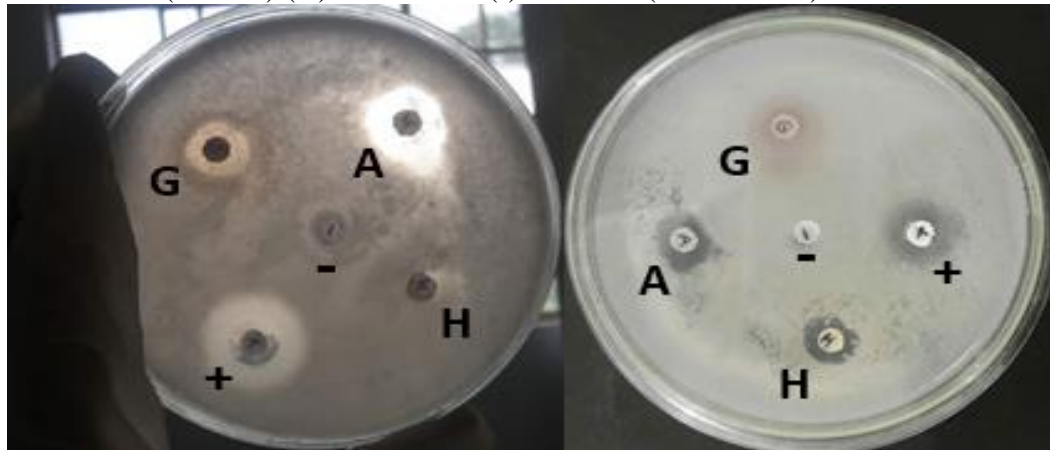
É possível observar que o extrato de *R. graveolens* (arruda) apresentou maior capacidade de inibição do crescimento de *C. albicans*, tendo um padrão de inibição semelhante ao apresentado pelo fluconazol (Figura 2).

Em comparação ao diluente (Álcool 70%), a arruda ($p < 0,001$) apresentou diferença significativa indicando que o potencial de inibição do extrato foi devido as propriedades constituintes da planta e não do solvente usado para a produção do extrato. Dessa maneira, esse resultado está de acordo com dados obtidos na pesquisa de Araujo *et al.* (2008), em que foi avaliado o potencial antifúngico do *R. graveolens* contra diversos microrganismos oportunistas responsáveis por causar doenças em seres humanos, incluindo algumas espécies de *Candida* como *C. albicans* e *Candida tropicalis*. Para estas leveduras foi observado que o óleo essencial da arruda apresentou halos de 10 a 20 mm. Esse resultado foi semelhante ao encontrado no presente estudo.

Quando comparado aos extratos de *Pelargonium graveolens* e *Hibiscus cannabinus*, o extrato de *R. graveolens* teve maior capacidade de inibir o crescimento de *C. albicans*, sendo que em

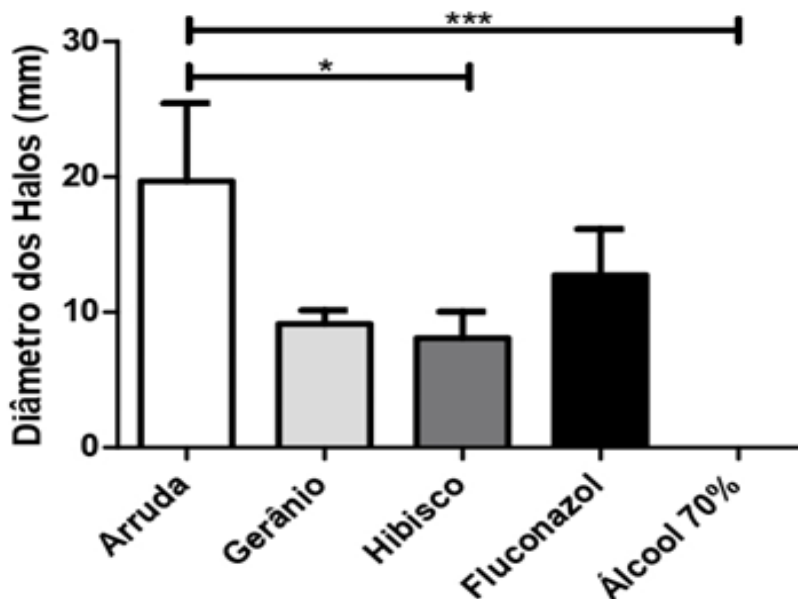
comparação a *H. cannabinus* ($p < 0,01$) demonstrou diferença significativa, já que o Hibisco não apresentou diferença estatística com o álcool 70%.

Figura 1 - Teste de Difusão em ágar. Halos de inibição dos extratos de *Ruta graveolens* (arruda) (A), *Pelargonium graveolens* (gerânio) (G) e *Hibiscus cannabinus* (hibisco) (H) Fluconazol (I) Diluente (Álcool 70%).



Fonte: os autores.

Figura 2 - Media dos halos de inibição representados em milímetro. Comparação entre os extratos e controles positivos e negativos, onde ***: $p < 0,001$ entre Arruda (*Ruta graveolens*) e Álcool 70%; e *: $p < 0,01$ entre Arruda e Hibisco (*Hibiscus cannabinus*).



Fonte: Os autores.

O óleo volátil de *P. graveolens* e o seu potencial antifúngico foi comprovado em sinergismo com anfotericina B contra *Candida* sp. em um estudo feito por Rosato *et al.* (2008), em que foi demonstrado a inibição de todas as espécies de *Candida* incluindo *C. albicans*, assim como, comprovada a atividade fungistática contra cepas de *Aspergillus flavus*. Esse resultado está de acordo com os obtidos na presente pesquisa, ressaltando que nessa, foi utilizado o extrato alcoólico da planta, que é mais econômico e de fácil acesso para o uso popular. Vale ressaltar que não foram encontrados outros estudos utilizando-se o extrato alcoólico de *P. graveolens* contra o crescimento fúngico de *C. albicans*.

Apesar dos extratos de *P. graveolens* e *H. cannabinus* não apresentarem diferença significativa comparando-se ao fluconazol e a *R. graveolens*, os dois extratos demonstraram atividade antifúngica contra *C. albicans*, o que corrobora um resultado científico importante.

Foi observado que os três extratos possuíam CIM de 100 mg.mL⁻¹ sendo essa concentração mais eficaz para inibir 100% do crescimento fúngico.

Um estudo conduzido em 2008 no Hospital Universitário Lauro Wanderley testou a atividade antimicrobiana do óleo essencial de arruda contra cepas de *Candida* spp. isoladas de pacientes que continham otite externa aguda, e foi concluído que o óleo essencial de *R. graveolens* com sua concentração em 4% (2500 µg/ml) foi capaz de inibir as cepas de *Candida* spp. (NOGUEIRA *et al.*, 2008). Os resultados obtidos por esses autores estão de acordo com os dados obtidos pelo presente estudo, levando em consideração que este foi desenvolvido com a utilização do extrato alcoólico que apresenta concentração inicial mais baixa (200 mg.mL⁻¹) que o óleo essencial utilizado por Nogueira *et al.* (2008).

Em relação ao extrato de *Pelargonium graveolens*, uma pesquisa feita por Raut *et al.* (2014) sobre as propriedades medicinais de óleos essenciais demonstrou atividade fungicida do óleo essencial do Gerânio contra *C. albicans* em concentrações de até 0,15% (RAUT *et al.*, 2014). Nesse estudo, *P. graveolens* também demonstrou atividade antifúngica em todas as concentrações testadas, mas apenas as maiores concentrações de 200 mg.mL⁻¹ e 10 mg.mL⁻¹ foram capazes de inibir 100% o crescimento de *C. albicans*. Deve-se levar em consideração que o óleo essencial é mais concentrado uma vez que não se utiliza nenhum solvente para sua extração.

Não foram encontrados estudos que avaliam a atividade inibitória de *H. cannabinus* contra o crescimento fúngico de *C. albicans* ou de alguma espécie pertencente ao gênero *Candida*, tornando a presente pesquisa pioneira nesse sentido.

CONCLUSÃO

Os resultados apontam que possivelmente os extratos analisados de *Ruta graveolens*, *Pelargonium graveolens* e *Hibiscus cannabinus* são capazes de inibir crescimento de *C. albicans*. No entanto, *Ruta graveolens* obteve a melhor atividade antifúngica contra *C. albicans* dentre todos os extratos testados.

Sugere-se que sejam feitos testes *in vivo* para a comprovação desse extrato como um potencial tratamento de infecções causadas por *C. albicans*, principalmente a partir do estudo dos seus constituintes químicos. Outras pesquisas são necessárias com a produção de pomadas e loções do extrato, já que *R. graveolens* não é recomendado como medicamento de uso sistêmico.

Os outros extratos testados, *Pelargonium graveolens* e *Hibiscus cannabinus* apresentaram atividade antifúngica menor quando comparados à atividade antifúngica apresentada por *R. graveolens* e ao fluconazol, ainda assim, pode-se sugerir que ambos os extratos possam ser utilizados como tratamento complementar aos antifúngicos usuais. São necessárias pesquisas *in vivo* para a comprovação de atividades terapêuticas, determinação de dosagens e tipo de uso (sistêmico ou tópico).

Essa pesquisa foi a primeira a avaliar o potencial de inibição de *Hibiscus cannabinus* contra o crescimento de *C. albicans*, sendo de muita relevância para embasar futuros estudos envolvendo a atividade antifúngica exercida por essa e outras plantas que são fonte de novos fármacos frente a fungos causadores de patologias humanas.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, J. C. L. V. *et al.* Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 33, n. 1, p. 55-64, 2008.

BARBEDO, L. S. *et al.* Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.

BARROS, B. S. **Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Mentha piperita* L. sobre cepas de *Candida albicans***. 40f. Monografia (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Série B. Textos Básicos de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

CANNON, R. D. *et al.* *Candida albicans* drug resistance – another way to cope with stress. **Microbiology**, v. 153, p. 3211-3217, 2007.

CARVALHO, I. O. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e cremes dentais fitoterápicos em bactérias cariogênicas**. 2016. 102f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Aplicada) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2016.

CORREA, R. O. **Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de extratos vegetais frente aos principais microorganismos causadores da candidíase**. 2017. 101f. Dissertação (Mestrado em Saúde) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017.

FERREIRA, J. L. S. Comparação da atividade antifúngica do extrato aquoso e do extrato etanólico de *Rhaphiodon Echinus* (Lamiaceae) contra cepas *Candida Tropicalis*. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 17, n. 1, p. 1, 2019.

MAGALHÃES, R. R. *et al.* Obtenção do extrato de *Anadenanthera falcata* (Angico) e avaliação do dano genotóxico deste extrato sobre *Candida Albicans*. **Anais do Programa de Iniciação Científica da UniEVANGÉLICA**. v. 22, n. 3, 2019.

NOGUEIRA, J. C. R.; *et al.* Atividade antimicrobiana *in vitro* de produtos vegetais em otite externa aguda. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 74 n. 1, p. 118-124, 2008.

OLIVEIRA, C. T. **Caracterização química, atividade antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial de *Baccharis oreophila* Malme**. 2016. 59f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2016.

RAUT, J. S. *et al.* A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250-264, 2014.

ROSATO, A. *et al.* A inibição de espécies de *Candida* por óleos essenciais selecionados e seu sinergismo com anfotericina B. **Phytomedicine**, v. 15, n. 8, p. 635-638, 2008.

SILVA, H. M. **Caracterização e identificação de leveduras do gênero *Candida***. 67f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical e Saúde Pública) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

VANDEPUTTE, P. *et al.* Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 11, p. 4608-4615, 2005.

VIEIRA, A. J. H.; SANTOS, J. I. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 3, p. 235-238, 2017.