

ESTUDO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO DE GUACO (*Mikania glomerata*) CONTRA *Candida albicans*

Renata Dias Pereira

Graduada em Ciências Biológicas pela Faculdade de Saúde Ibituruna-FASI

Juliana Aparecida Fonseca Veloso

Graduada em Ciências Biológicas pela Faculdade de Saúde Ibituruna-FASI

Helen Ferreira Mota

Graduação em andamento em Farmácia pela Faculdade de Saúde Ibituruna-FASI

Bárbara Caroline Ferreira Mota

Mestre em Biotecnologia pela Universidade Estadual de Montes Claros-UNIMONTES

Ronilson Ferreira Freitas

Mestrado em andamento em Saúde, Sociedade e Ambiente pela Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri-UFVJM
ronnypharmacia@gmail.com

Vanessa de Andrade Royo

Doutorado em Ciências Farmacêuticas (Produtos Naturais e Sintéticos) pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo-FCFRP/USP

Recebido em: 01/04/2014

Aprovado em: 10/10/2014

RESUMO

As infecções hospitalares e a resistência aos antifúngicos são problemas crescentes na saúde pública. *Candida albicans* é considerada a principal espécie do gênero *Candida* representando cerca de 90% dos processos infecciosos de candidíase. O presente estudo teve como objetivo determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do extrato bruto de *Mikania glomerata* (guaco) contra isolados clínicos de *C. albicans*. Cinco amostras do fungo coletadas em laboratórios clínicos foram identificadas como A, B, C, D e E. O extrato hidroalcolólico das folhas de guaco foi obtido por maceração exaustiva e diluído em solução tween em salina nas concentrações entre 50 e 400 µg/mL. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo e como controle foi utilizado o antifúngico nistatina. Após 48 de incubação, foram preparadas lâminas com 10 µL do conteúdo de cada poço e azul de lactofenol. As concentrações inibitórias mínimas obtidas foram <400, <300, <250 e <50 µg/mL para os isolados A, B, D e E, respectivamente. Para o isolado C, não foi observado crescimento nas contrações testadas. Portanto, o extrato bruto de *M. glomerata* apresentou atividade contra 80% dos isolados de *C. albicans*, sugerindo a presença de compostos ativos e a possibilidade de desenvolvimento de um agente antifúngico.

Palavras-chave: *Candida albicans*. *Mikania glomerata*. Infecções. Saúde Pública.

STUDY *in vitro* OF ACTIVITY ANTIFUNGAL GUACO EXTRACT (*Mikania glomerata*) AGAINST *Candida albicans*

ABSTRACT

Nosocomial infections and antifungal resistance are increasing concerns in public health. *Candida albicans* is considered main specie of *Candida* genus, representing 90% of candidiasis cases. Then, this study aimed to determine Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of *Mikania glomerata* crude extract against *Candida albicans* clinical isolates. For this, five samples of fungus collected in clinical laboratories were identified as A, B, C, D and E. The hydroalcoholic extract of guaco leaves was obtained by exhaustive maceration and diluted in tween solution of saline between 50 and 400 µg/mL. Antimicrobial activity was carried out by microdilution techniques and as positive control was used nystatin antifungal. After incubation, slides were prepared with 10 µL of each well content and lactophenol blue. The results showed that minimum inhibitory concentrations obtained were <400, <300, <250 and <50 µg/mL for A, B, D and E samples, respectively. To C sample the extract was inactive in analyzed concentrations. So, the *M. glomerata* crude extract showed activity against 80% of *C. albicans* isolates, suggesting the presence of active compounds and the possibility of developing an antifungal agent.

Keywords: *Candida albicans*. *Mikania glomerata*. Infections. Public health.

1 INTRODUÇÃO

As infecções hospitalares e a resistência aos antifúngicos são problemas crescentes na saúde pública (MORETTI, 2007; STOPPA et al., 2009). De acordo com Berrouane et al. (1999) e Maluche e Santos (2008), a maioria dessas infecções é causada, principalmente, pelos fungos leveduriformes do gênero *Candida*. Esse grupo possui aproximadamente 200 espécies, porém somente 10% podem colonizar o corpo humano. São considerados patógenos oportunistas, porém o comensalismo existente entre fungos e hospedeiros pode desencadear uma relação parasitária e o desenvolvimento de infecções denominadas candidíases (ÁLVARES et al., 2007).

Candida albicans é considerada a principal espécie patogênica, sendo responsável por 90% dos casos de infecções (FRIDKIN et al., 1996). Produz quadros infecciosos na vulva, vagina, e raramente no útero. Além disso, pode agravar os quadros infecciosos em pacientes imunocomprometidos, diabéticos e usuários recorrentes de antibióticos de amplo espectro (FIDEL et al., 1999; LIMA et al., 2006). Algumas características, ou fatores de virulência, são responsáveis pela patogenicidade de *C.*

albicans como adesão a substratos inertes e biológicos, formação de tubo germinativo, variabilidade fenotípica e genotípica, variabilidade antigênica, imunomodulação do hospedeiro, dentre outras (ÁLVARES et al., 2007).

O aumento significativo das infecções nosocomiais oportunistas e terapia antifúngica limitada demonstram a necessidade de novos antifúngicos mais eficientes e menos tóxicos (COLOMBO et al., 2007; FRIDKIN et al., 1996; MORETTI, 2007). Diante disso e da grande variedade terapêutica oferecida pelas plantas, cada vez mais são feitos investimentos na busca de agentes farmacologicamente ativos (LIMA et al., 2006).

Mikania glomerata Sprengel, espécie da família Asteraceae, conhecida popularmente como guaco, nativa do sul do Brasil, é encontrada em Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (ROCHA et al., 2008). É muito cultivada, pois apresenta várias propriedades como ação broncodilatadora, antiasmática, expectorante, febrífuga, antigripal e estimulante de apetite (ABOY et al., 2002). Além disso, é eficaz no combate de traumatismos, nevralgias, dores reumáticas e pruridos (LORENZI, 2002).

Estudos realizados com o óleo essencial de *M. glomerata* verificaram forte atividade contra espécies do gênero *Candida* e dentre os componentes deste óleo alguns apresentaram atividade antimicrobiana (BARATTO et al., 2008). Algumas espécies dessa família são conhecidas na medicina popular pelas propriedades analgésicas, anti-inflamatória, antimicrobiana, dentre outras, sendo *M. glomerata* alvo do estudo em questão (ROCHA et al., 2008). Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do extrato foliar de *M. glomerata* contra isolados clínicos de *C. albicans*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As folhas de *M. glomerata* foram coletadas em julho de 2009 no Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais-ICA/UFMG, campus Montes Claros-MG. O material vegetal foi seco em estufa de ar circulante a 40 °C por aproximadamente 20 horas, em seguida, foi pulverizado rendendo 50 g de material seco.

O extrato bruto foi obtido por maceração exaustiva com quatro porções de 250 mL de etanol 96 °GL por sete dias. Após cada semana, o material resultante foi filtrado e o solvente extraído em evaporador rotativo. O extrato obtido foi mantido em estufa

por 48 horas a 40 °C, para total secagem. A solução teste do extrato foi preparada a 400 µg/mL em solução de tween 80 a 5% em salina.

Os isolados de *C. albicans* foram doados de Laboratórios clínicos de Montes Claros provenientes de pacientes diferentes, não identificados. As amostras foram classificadas como A, B, C, D e E. As suspensões foram preparadas em solução salina estéril (NaCl a 0,85%) e padronizadas por comparação com o tubo 0,5 da escala McFarland (0,1 mL de cloreto de bário a 1,0% + 9,9 mL de ácido sulfúrico a 1,0%) por meio de verificação das absorvâncias em 625 nm (NCCLS, 2014). Em seguida, foi feita diluição do meio de cultivo líquido de modo a fornecer o inóculo de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL (Unidade Formadora de Colônia). Para determinação da CIM, foi utilizada a técnica de microdiluição.

A concentração inicial do extrato bruto foi de 400 µg/mL e nos poços seguintes foi adicionado meio de cultura (Ágar Sabouround Dextrose) de forma que a concentração diminuísse de 50 em 50 µg/ µL. Como controles positivos, foram adicionados 20 µL de inóculo (*Candida albicans*) e 80 µL de caldo (meio de cultivo líquido) para testar o crescimento do fungo e como controles negativos 20 µL de inoculo (*Candida albicans*), 70 µL de caldo (meio de cultivo líquido) e 10 µL do antifúngico nistatina (50 µg/ µL).

O experimento foi realizado em triplicada para cada amostra de *C. albicans* (A, B, C, D e E). Após 48 horas de incubação a 35 ± 2 °C, foi feita a leitura em microscópio óptico, objetiva de 40 x, utilizando lâminas com 10 µL do conteúdo de cada poço, referente aos controles e às amostras, e uma gota da solução azul de lactofenol (STOPPA et al., 2009).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato bruto de *M. glomerata* apresentou atividade sobre quatro dos cinco isolados de *C. albicans* analisados, porém a amplitude da ação foi bastante variada (Tabela 1). As concentrações inibitórias mínimas apresentadas foram <400 µg/mL, <300 µg/mL, <250 µg/mL e <50 µg/mL para os isolados A, B, D e E, respectivamente (TAB. 1).

Para o isolado C, o extrato não foi ativo, sendo observado crescimento das leveduras em todas as concentrações testadas. Nas concentrações em que houve

desenvolvimento de A, B, D e E este apresentou taxa menor que uma levedura por campo. Os controles, positivo e negativo, responderam como esperado, com crescimento presente e ausente, respectivamente.

Tabela 1– Ação do extrato de *M. glomerata* em isolados clínicos de *C. albicans*

[Extrato] µg/mL	Isolado clínico de <i>C. albicans</i>				
	A	B	C	D	E
400	NC	NC	C	NC	NC
350	C	NC	C	NC	NC
300	C	NC	C	NC	NC
250	C	C	C	NC	NC
200	C	C	C	C	NC
150	C	C	C	C	NC
100	C	C	C	C	NC
50	C	C	C	C	NC

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: NC – Não houve crescimento; C – Houve crescimento.

As infecções fúngicas são de difícil tratamento o que relaciona principalmente a resistência dos agentes etiológicos aos antifúngicos atualmente utilizados (ARAÚJO et al., 2004). Em vista dessa atual situação, a investigação por novas substâncias ativas de fontes naturais, incluindo as plantas, vem ganhando importância na indústria farmacêutica (DUARTE, 2006). Como os produtos naturais possuem potencial antibiótico, conseqüentemente, representam a possibilidade efetiva na prevenção e tratamento de doenças infecciosas de origem fúngica (LIMA et al., 2006).

A candidíase representa a infecção mais comum e *C. albicans* a espécie mais recorrente (FIDEL et al., 1999; LIMA et al., 2006). Vários processos como, por exemplo, o uso de medicamentos seletivos e novas patologias, contribuíram para o surgimento de cepas de *C. albicans* mais virulentas (BERROUANE et al., 1999). Assim sendo, a variação das CIMs obtidas sugere a existência de cepas com mecanismos de resistência e mais virulentas, uma vez que as amostras testadas possuem origens diferentes.

Estudos comprovaram que *M. glomerata*, por meio do óleo essencial, exibiu uma forte atividade contra *C. albicans* (BARATTO et al., 2008). Além disso, estudos

das atividades farmacológicas dessa espécie apontam para as atividades antiespasmódica, antiedematogênica, broncodilatadora, espasmolítica, vasodilatadora, antiofídica e antimicrobiana (ABOY et al., 2002; DUARTE et al., 2004; PESSINI et al., 2003; ROCHA et al., 2008; SILVA et al., 2005).

O extrato de *M. glomerata* apresentou forte atividade, com inibições de 0,04 a 0,12 mg/mL para *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecium* (DUARTE et al., 2006). Ruppelt et al. (1991) estudaram a atividade analgésica e antiinflamatória do chá de guaco. Estudos químicos evidenciaram quantidades significativas dos compostos terpenóides, cumarinas, flavonóides e diversos açúcares, sendo a cumarina frequentemente mencionada como substância ativa (ABOY et al., 2002; AMARAL et al., 2003).

Holetz et al. (2002) classificaram os extratos vegetais quanto à atividade antimicrobiana, sendo boa (CIM < 100 µg/mL), moderada (CIM de 500 a 1000 µg/mL) e baixa (CIM maior que 1000 µg/mL). Assim, de acordo com os resultados obtidos, o extrato bruto de *M. glomerata* pode ser classificado como moderadamente ativo, uma vez que apresentou CIMs menores que 500 µg/mL para maioria das amostras avaliadas.

Portanto, este estudo demonstra a importância de estudos mais aprofundados envolvendo a ação do extrato de guaco contra *C. albicans*, utilizando um número maior de amostras e cepa padrão como referência. Além disso, é necessária realização de estudos toxicológicos e clínicos como suporte de segurança para o uso deste produto como antifúngico.

4 CONCLUSÃO

Observou-se a presença de atividade antifúngica contra *C. albicans* em 80% dos isolados clínicos testados, obtendo concentração inibitória mínima (CIM) entre 50 e 400 µg/mL. É interessante ressaltar que nos poços onde houve crescimento, este foi muito pequeno (<1/campo) comprovando que o extrato hidroalcolico bruto de *M. glomerata* é ativo contra *C. albicans*.

REFERÊNCIAS

ABOY, A. L.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; LANGELOH, A.; BASSANI, V. L. Atividade antiespasmódica de soluções extrativas de folhas de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco). **Acta Farmacêutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 21, n. 3, p. 185-91, 2002.

ÁLVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 5, p. 319-27, 2007.

AMARAL, R. R.; ARCENIO NETO, F.; CARVALHO, E. S.; TEIXEIRA, L. A.; ARAÚJO, G. L.; SHARAPIN, N.; TESTA, B.; GNERRE, C.; ROCHA, L. Avaliação da atividade IMAO e antibacteriana de extratos de *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 13, p. 24-27, 2003.

ARAÚJO, J. C. L. V.; LIMA, E. O.; CEBALHOS, B. S. O.; FREIRE, K. R. L.; SOUZA, E. L.; FILHO, L. S. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 33, p. 55-64, 2004.

BARATTO, L.; LANG, K. L.; VANZ, D. C.; REGINATTO, F. H.; OLIVEIRA, J. B.; FALKENBERG, M. Investigação das atividades alelopática e antimicrobiana de *Mikania laevigata* (Asteraceae) obtida de cultivos hidropônico e tradicional. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 18, n. 4, p. 577-82, 2008.

BERROUANE, Y. F.; HERWALDT, L. A.; PFALLER, M. A. Trends in antifungal use and epidemiology of nosocomial yeast infections in university hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, D.C, v. 37, n. 3, p. 531-37, 1999.

COLOMBO, A. L. Diagnóstico de doenças fúngicas oportunistas: o grande desafio para os centros médicos de atendimento terciário. **Revista Prática Hospitalar**, São Paulo, v. 52, p. 50-55, 2007.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **MultiCiência**, São Carlos, v. 7, p. 1-16, 2006.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; PEREIRA, B.; MAGALHÃES, P. M.; DELARMELINA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 14, n. 1, p. 6-8, 2004.

FIDEL JR, P. L.; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, D.C, v. 12, n. 1, p. 80-96, 1999.

FRIDKIN, S. K.; JARVIS, W. R. Epidemiology of nosocomial fungal infections. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, D.C, v. 9, n. 4, p. 499-511, 1996.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D. Screening of some plants used in the Brazilian

folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 7, p. 1027-31, 2002.

LIMA, M. R. F.; LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; ANDRADE, M. C. C.; SANT'ANA, A. E. G.; GENET, J. P.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, USA, v. 21, p. 137-47, 2006.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MALUCHE, M. E.; SANTOS, J. I. *Candida sp.* e infecções hospitalares: aspectos epidemiológicos e laboratoriais. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 1, p. 65-67, 2008.

MORETTI, M. L. A importância crescente das infecções fúngicas. **Revista Panamericana de Infectologia**, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 8-9, 2007.

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standarts. **Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão**: norma aprovada. 2003. v. 23.

PESSINI, G. L.; HOLETZ, F. B.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 13, p. 21-24, 2003.

ROCHA, L.; LUCIO, E. M. A.; FRANÇA, H. S.; SHARAPIN, N. *Mikania glomerata* Spreng: desenvolvimento de um produto fitoterápico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 18, p. 744-47, 2008.

RUPPELT, B. M.; PEREIRA, E. F. R.; GONÇALVES, L. C.; PEREIRA, N. A. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom – I. Analgesic and anti-inflammatory activities. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 2, p. 203-205, 1991.

SILVA, M. I. G., SOUSA, F. C. F., GONDIM, A. P. S. Herbal therapy in primary health care in Maracanaú, Ceará, Brazil. **Annals of Pharmacotherapy**, USA, v. 39, p. 1336-41, 2005.

STOPPA, M. A.; CASEMIRO, L. A.; VINHOLIS, A. H. C.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A.; MARTINS, C. H. G. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 498-502, 2009.