

POTENCIAL ANTIFÚNGICO *IN VITRO* DOS EXTRATOS GLICÓLICOS DE *Rosmarinus officinalis* E *Syzygium cumini* SOBRE CEPAS CLÍNICAS DE *Candida spp.*

Costa A.C.B.P.¹, Pereira C.A.¹, Almeida R.B.A.¹, Junqueira J.C.¹, Jorge A.O.C.¹

¹ Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal - Laboratório de Microbiologia e Imunologia

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - Jd. São Dimas - São José dos Campos, SP - Brasil

Cep: 12245-000 - Telefone: (12) 3947-9033/ e-mail: carol_bilog@yahoo.com.br

Resumo: Leveduras do gênero *Candida* estão presentes na cavidade bucal de indivíduos saudáveis, podendo tornar-se patogênicas na dependência de fatores predisponentes. O uso de extratos brutos de plantas medicinais tem merecido a atenção de pesquisadores de vários países, já que podem inibir o crescimento microbiano. O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a ação antimicrobiana de extratos glicólicos a 20% de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e jambolão (*Syzygium cumini*) sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada através do método de microdiluição em caldo, sendo posteriormente contaminadas com suspensões fúngicas (10^6 céls/mL) e incubadas à 37°C/24h. A seguir, as amostras foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose e incubadas a 37°C/48h para determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM). Os extratos glicólicos de alecrim e jambolão foram efetivos na inibição do crescimento de todas as cepas fúngicas. O extrato de alecrim apresentou as menores CIM e CFM. Concluiu-se que alecrim e jambolão apresentaram efeitos fungicidas, sendo o efeito do alecrim mais significativo do que o jambolão.

Palavras-chave: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Syzygium cumini*.

Área do Conhecimento: Microbiologia

Introdução

As espécies de *Candida* fazem parte da microbiota comensal da cavidade bucal, entretanto sob determinadas condições, comportam-se como patógenos oportunistas, produzindo infecções que vão desde lesões mucosas superficiais até disseminações sistêmicas graves e invasivas (DE REPENTIGNY ET AL. 2000; LEUNG ET AL. 2000). A espécie mais isolada dessas infecções é *C. albicans*, seguida das espécies não-*albicans* *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (SANT'ANA et al., 2002).

Nos últimos anos, vem crescendo o interesse por produtos naturais, devido às reações adversas e a resistência microbiana aos medicamentos convencionais. Estudos têm sido realizados com intuito de pesquisar a ação antimicrobiana de óleos essenciais e extratos de plantas medicinais frente a bactérias e fungos (PINTO ET AL. 2000).

As plantas alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e jambolão (*Syzygium cumini*) têm sido investigadas quanto o seu potencial antimicrobiano. Aníbal (2007) analisou a atividade antimicrobiana dos extratos diclorometânico e metanólico de algumas plantas sobre cepas padrão de diversos microrganismos.

Neste trabalho ambos os extratos, diclorometânico e metanólico, de jambolão e alecrim inibiram o crescimento de vários microrganismos, dentre os quais estavam *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*.

Devido à resistência dos microrganismos aos antimicrobianos atuais, faz-se necessário a realização de estudos *in vitro* sobre a ação antifúngica de extratos naturais, podendo futuramente tornar-se uma alternativa na odontologia para o tratamento das infecções bucais. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antifúngico dos extratos glicólicos das plantas *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e *Syzygium cumini* (jambolão) sobre cepas clínicas de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, isoladas da cavidade bucal.

Metodologia

Extratos

Foram utilizados neste estudo extratos glicólicos de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e jambolão (*Syzygium cumini*), adquiridos da empresa Yod Ervas (Campinas, São Paulo, Brasil). Na preparação foram utilizados 20% de massa seca dos extratos obtida através da folha de cada planta, diluída em propileno glicol, resultando numa concentração de 200 mg/mL. O

solvente propileno glicol isoladamente não apresentou atividade antifúngica.

Cepas de *Candida*

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos / UNESP com protocolo n° 020/2008 – PH/CEP.

A atividade antifúngica dos extratos glicólicos foi avaliada em 30 cepas de leveduras do gênero *Candida*, sendo 14 *C. albicans*, 8 *C. glabrata* e 8 *C. tropicalis*, provenientes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP. Estas cepas foram isoladas da cavidade bucal de indivíduos submetidos à terapia com antibióticos por tempo prolongado para o tratamento da tuberculose pulmonar.

As cepas foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, USA) e incubadas a 37°C por 24 horas. Após, colônias foram suspensas em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) ajustadas por espectrofotômetro (Micronal B582, São Paulo, Brasil) até uma suspensão padronizada com 10⁶ células/mL. Os parâmetros de densidade óptica e de comprimento de onda utilizados foram 0,284 e 530 nm, respectivamente.

Ensaio do potencial antifúngico dos extratos

Os ensaios do potencial antifúngico dos extratos foram realizados pelo método de microdiluição em caldo. Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram realizadas diluições seriadas a partir de 1 mL dos extratos em placas de cultura de células de 24 poços (Costar Corning, New York, EUA) contendo 1 mL de caldo Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, USA) em cada poço, de forma a representarem 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125% e 1,562%, da concentração original (200 mg/mL). Após, foram acrescentados 100 µL da suspensão de cada cepa fúngica. A CIM foi considerada como a menor concentração dos extratos glicólicos testados que inibiu o crescimento visível das leveduras, ou seja, sem turvação do caldo e depósito do microrganismo. Após incubação por 24 horas a 37°C, foi realizado o ensaio para determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM).

Alíquotas de 100 µL das três últimas diluições que não apresentaram crescimento fúngico foram semeadas em placas de Petri com ágar Sabouraud dextrose e incubadas por 48 horas. A CFM foi definida como a menor concentração dos extratos glicólicos testados que não apresentou crescimento fúngico em ágar. O grupo controle positivo foi constituído por caldo Sabouraud e o inóculo fúngico avaliado. Já o grupo controle negativo foi constituído por caldo

Sabouraud e os extratos testados. Todo o experimento foi realizado em duplicata.

Resultados

Os resultados das CIM, CFM, médias e desvios padrões (dp) obtidos para os extratos testados estão representados respectivamente nas Tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1 - CIM (%) e CFM (%) obtidos pelos extratos sobre cepas clínicas de *C. albicans*.

Cepa	Alecrim		Jambolão	
	CIM	CFM	CIM	CFM
1	3,125	6,25	6,25	12,5
2	12,5	25	12,5	25
3	12,5	25	12,5	25
4	6,25	12,5	6,25	6,25
5	12,5	6,25	12,5	25
6	12,5	25	12,5	25
7	6,25	12,5	12,5	25
8	6,25	12,5	12,5	12,5
9	12,5	12,5	12,5	25
10	12,5	25	12,5	12,5
11	6,25	12,5	25	25
12	12,5	12,5	25	25
13	12,5	12,5	12,5	12,5
14	12,5	25	25	25
Média	10,04	16,07	14,29	20,09
dp	3,51	7,24	6,22	7,01

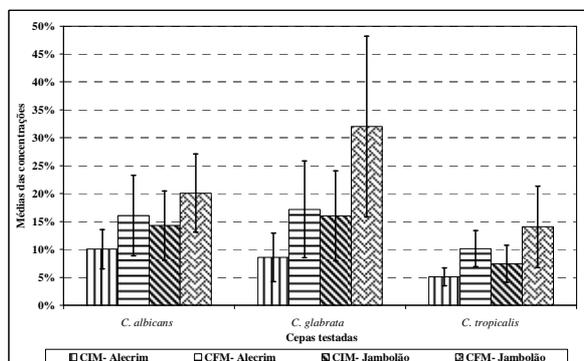
Tabela 2 - CIM (%) e CFM (%) obtidos pelos extratos sobre cepas clínicas de *C. glabrata*.

Cepa	Alecrim		Jambolão	
	CIM	CFM	CIM	CFM
1	6,25	12,5	25	50
2	12,5	25	25	50
3	12,5	25	12,5	25
4	6,25	12,5	12,5	25
5	3,125	6,25	3,125	6,25
6	12,5	25	12,5	25
7	12,5	25	25	50
8	3,125	6,25	12,5	25
Média	8,59	17,19	16,02	32,03
dp	4,34	8,68	8,09	16,17

Tabela 3 - CIM (%) e CFM (%) obtidos pelos extratos sobre cepas clínicas de *C. tropicalis*.

Cepa	Alecrim		Jambolão	
	CIM	CFM	CIM	CFM
1	3,125	6,25	6,25	12,5
2	3,125	6,25	6,25	6,25
3	6,25	12,5	6,25	12,5
4	6,25	12,5	6,25	12,5
5	6,25	12,5	12,5	25
6	6,25	12,5	6,25	12,5
7	3,125	6,25	3,125	6,25
8	6,25	12,5	12,5	25
Média	5,08	10,16	7,42	14,06
dp	1,62	3,23	3,31	7,28

A Figura 1 representa graficamente as médias e os desvios padrões da CIM e CFM obtidas para os extratos testados.



Discussão

O aumento prevalente de microrganismos multi-resistentes, assim como o aparecimento de efeitos indesejáveis de algumas drogas, faz com que a busca por novos agentes antimicrobianos seja uma importante estratégia no estabelecimento de terapias alternativas para infecções de difícil tratamento (PEREIRA ET AL. 2006, PHONGPAICHIT ET AL. 2005). Deste modo, muitos pesquisadores têm demonstrado grande interesse na investigação de extratos de plantas, com potencial antimicrobiano (VOLPATO, 2005).

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que as cepas clínicas testadas apresentaram sensibilidade significativa frente aos extratos glicólicos de alecrim e jambolão.

Dentre as leveduras testadas, *C. tropicalis* foi a mais sensível aos extratos utilizados. Por outro lado as cepas de *C. albicans* foram mais susceptíveis ao extrato de jambolão, enquanto para as cepas de *C. glabrata* o extrato mais eficaz foi o de alecrim. Estes dados são relevantes uma vez que *C. glabrata* e *C. albicans* apresentam baixa susceptibilidade antifúngicos convencionais (SANT'ANA ET AL., 2002).

Para avaliar se as CIM obtidas apresentaram efeito fungicida ou fungioestático sobre as cepas testadas, foi realizado o ensaio para determinar a CFM. Para o extrato de alecrim o efeito fungicida da CIM foi observado em 3 cepas de *C. albicans* (cepas 9, 12 e 13). Para o extrato de jambolão o efeito fungicida foi observado em 7 cepas de *C. albicans* (cepas 4, 8, 10, 11, 12, 13 e 14) e 1 cepa de *C. tropicalis* (cepa 2). Nenhum dos extratos testados apresentou CIM com efeito fungicida para as cepas de *C. glabrata*.

A planta alecrim é rica em terpenos, metabólito secundário com característica lipofílica que tende a compartilhar a fase aquosa das estruturas da membrana, causando sua

expansão, aumento da fluidez ou desordem da estrutura da mesma, além de inibição de enzimas ali embebidas (SIKKEMA, 1995). Estes efeitos possivelmente podem ser os responsáveis pelos resultados encontrados neste estudo, no qual o efeito antifúngico obtido foi satisfatório sobre as cepas clínicas de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, com médias de CIM em 10,04% (dp= 3,51%), 8,59% (dp= 4,34%) e 5,08% (dp= 1,62%), respectivamente. A literatura relata que preparações realizadas com esta planta apresentam ação contra isolados do gênero *Candida*, demonstrando o potencial antifúngico da mesma (LIMA ET AL., 2006).

As folhas da planta jambolão são ricas em taninos e saponinas (LOGUERCIO ET AL., 2005). Segundo Scalbert (1991) é possível que o tanino apresente atividade antimicrobiana por agir inibindo enzimas bacterianas e fúngicas. Como observado no presente estudo, estes efeitos podem ter contribuído para a sensibilidade demonstrada pelas leveduras, principalmente em relação à manutenção do efeito antifúngico observado para os valores de algumas CFM apresentadas. Segundo a literatura pesquisada, o jambolão demonstra potencial antifúngico desejável, visto que apresenta atividade antimicrobiana sobre cepas resistentes de bactérias e fungos (OLIVEIRA ET AL., 2007). Neste estudo o extrato de jambolão apresentou para as cepas de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, médias de CIM de 14,29% (dp= 6,22%), 16,02% (dp= 8,09%) e 7,42% (dp= 3,31%).

Nascimento et al (2000) em um estudo com 7 extratos alcóolicos observaram que o extrato de jambolão apresentou o maior potencial antimicrobiano dentre os extratos testados sobre 13 cepas de bactérias e 1 cepa de *C. albicans*, apresentando zona de inibição ≥ 7 mm de diâmetro, contra o extrato de alecrim que apresentou ação somente sobre 1 cepa de bactéria e a única cepa de *C. albicans*. Outros trabalhos também obtiveram baixa atividade antimicrobiana para o alecrim (ARAUJO, 2004; LIMA ET AL., 2006). Porém os dados obtidos na atual pesquisa não corroboram os supracitados, podendo tais divergências ter ocorrido em razão das diversas formas de preparo dos extratos e diferenças na composição química da planta, determinada pelo local e condições de cultivo e época de colheita. Além disso, é importante ressaltar que a análise antifúngica realizada nos trabalhos aqui citados, foi em diferentes concentrações e metodologias (difusão em ágar, difusão em disco e diluição em caldo), dificultando a comparação segura entre os resultados. Segundo Eloff (1998), a técnica de microdiluição em caldo, realizada no presente

trabalho, apresenta 30 vezes mais sensibilidade do que as outras técnicas usadas para os ensaios com extratos de plantas.

Os resultados obtidos mostram-se satisfatórios para avaliações futuras do uso dessas plantas no tratamento de infecções fúngicas.

Conclusão

De acordo com os parâmetros deste estudo, os extratos glicólicos de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e jambolão (*Syzygium cumini*) utilizados foram efetivos na inibição do crescimento de todas as cepas de *Candida* analisadas. O extrato glicólico de alecrim foi mais eficaz, pois apresentou as menores CIM e CFM.

Referências

- ANIBAL, P.C. Potencial de ação antimicrobiana *in vitro* de extratos de plantas na inibição de *Candida* spp, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. 2007. 83f. Dissertação (Mestrado em Biologia Buco-Dental)– Universidade Estadual de Campinas, 2007
- ARAÚJO J.C.L.V.; LIMA E.O.; CEBALLOS B.S.O.; FREIRE K.R.L.; SOUZA E.L.; SANTOS FILHO L. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Rev. Patol. Trop.** V.33, p. 55-64, 2004.
- DE REPENTIGNY L.; AUMONT F.; BERNARD K.; BELHUMEUR P. Characterization of binding of *Candida albicans* to small intestinal mucin and its role in adherence to mucosal epithelial cells. **Infect. Immun.** V.68, n.6, p.3172-3179, 2000.
- ELOFF J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Med.** V.64, p.711-713, 1998.
- LEUNG W.K.; DASSANAYAKE R.S.; YAU J.Y.Y.; JIN L.J.; YAM W.C.; SAMARANAYAKE L.P. Oral colonization, phenotypic, and genotypic profiles of *Candida* species in irradiated, dentate, xerostomic nasopharyngeal carcinoma survivors. **J. Clin. Microbiol.** V.38, p.2219-2226, 2000.
- 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*. **Rev. Bras. Farm.** V.16, n.2, p.197-201, 2006.
- LOGUERCIO A.P.; BATTISTIN A.; VARGAS A.C.; HENZEL A.; WITT N.M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* L. Skells). **Ciênc. Rural.** V.35, n.2, p.371-376, 2005.
- NASCIMENTO G.G.F.; LOCATELLI J.; FREITAS P.C.; SILVA G.L.; Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Braz. J. Microbiol.** V.31, p.247-256, 2000.
- OLIVEIRA G.F.; FURTADO N.A.J.C.; SILVA-FILHO A.A.; MARTINS C.H.G.; BASTOS J.K.; CUNHA W.R.; et al. Antimicrobial activity of *Syzygium cumini* (Myrtaceae) leaves extract. **Braz. J. Microbiol.** V.38, n.2, p.381-384, 2007.
- PEREIRA E.M.; MACHADO T.B.; LEAL I.C.R.; JESUS D.M.; DAMASO C.R.A.; PINTO A.V.; et al. *Tabebuia avellanedae* naphthoquinones: activity against methicillin-resistant staphylococcal strains, cytotoxic activity and *in vivo* dermal irritability analysis. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.** V.5, n.5, p.1-7, 2006.
- PHONGPAICHIT S.; SUBHADHIRASAKUL S.; WATTANAPIROMSAKUL C. Antifungal activities of extracts from Thai medicinal plants against opportunistic fungal pathogens associated with AIDS patients. **Mycoses.** V.48, p. 333-338, 2005.
- PINTO C.N.; DANTAS A.P.; MOURA K.C.; EMERY F.S.; POLEQUEVITCH P.F.; PINTO M.C.; et al. Chemical reactivity studies with naphthoquinones from *Tabebuia* with anti-trypanosomal efficacy. **Adv. Drug. Res.** V. 50, p.1120-1128, 2000.
- SANT'ANA, P.L.; MILAN E.P.; MARTINEZ R.; QUEIROZ-TELLES, F.; FERREIRA, M.S.; ALCÂNTARA, A.P.; et al. Multicenter Brazilian study of oral *Candida* species isolated from Aids patients. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** V.97, p.253-257, 2002.
- SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry.** V.30, p.3875-3883, 1991.
- SIKKEMA J.; DE BONT J.A.; POOLMAN B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiol. Rev.** V.59, p.201-222, 1995.
- VOLPATO A.M.M. Avaliação do potencial antibacteriano de *Calendula officinalis* (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico. 2005. 137f. Tese (Doutorado em Ciências)-Universidade Federal do Paraná, 2005.