

ANÁLISE DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DE EXTRATO HIDROALCOÓLICOS DE *CITRUS AURANTIFOLIA* SOBRE *CANDIDA* *ALBICANS*

**Karen Cristine Santos Galvão, Mariella Vieira Pereira Leão, Célia Regina Gonçalves e
Silva, Silvana Soléo Ferreira dos Santos**

Universidade de Taubaté, Campus Bom Conselho, Laboratório de Microbiologia,
Av. Tiradentes, 500 - Centro - Taubaté - SP - CEP: 12030-180
karencristine13@gmail.com

Resumo - *Citrus aurantifolia*, conhecida popularmente por Lima da Pérsia, vem sendo usada na medicina popular como antimicrobiano, entre outros. O objetivo deste trabalho foi analisar a atividade inibitória de extratos hidroalcoólicos de *C. aurantifolia* sobre *Candida albicans*. Foram preparados extratos hidroalcoólicos do carpo, bagaço e casca de *C. aurantifolia in natura*. A atividade inibitória dos extratos em diversas concentrações foi avaliada pelo método de diluição em ágar. Foram preparados ainda meios sem a adição de extratos (controle). Após reativação, para cada cepa (n=25) foi preparada uma suspensão (10^6 céls/mL) que foi semeada nos meios adicionados dos extratos. Depois de incubadas observou-se a presença ou ausência de crescimento no meio. Na concentração de 2,5 % foram inibidas 44% das cepas com o extrato do suco e 100% com o extrato da casca. Para os demais extratos (carpo e bagaço) a concentração inibitória mínima foi de 5%. Extratos hidroalcoólicos de casca, carpo, bagaço e suco de *C. aurantifolia* demonstraram potencial inibitório sobre *C. albicans*.

Palavras-chave: Citrus aurantifolia, lima da pérsia, antimicrobiano

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas - Microbiologia

Introdução

As plantas do gênero *Citrus* são nativas do Iran e sua história de cultivo data de 4000 anos atrás, quando eram usadas de forma medicinal. Suas espécies possuem grande quantidade de ingredientes bioativos (fito-químicos e micronutrientes) com ação antiinflamatória, anti-infecciosa e antitumoral (Gharagozloo et al., 2002).

A introdução das plantas do gênero *Citrus* no Brasil, segundo registros antigos, data de 1530/40, início da colonização pelos portugueses. Estas responderam tão bem às condições brasileiras, principalmente em regiões costeiras, que representam um segmento econômico extremamente importante, tendo em vista o destaque do país como primeiro produtor mundial de citros (Amorim et al., 2008).

A ocorrência de leveduras do gênero *Candida* pode ser observada na microbiota residente humana. *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, podem ser isoladas das superfícies mucosas sadias da cavidade bucal, vagina, trato gastrointestinal e região retal. Até 80% dos indivíduos podem exibir colonização desses locais na ausência de doença. Quando estes fungos tornam-se

patogênicos, ao se aproveitarem da condição debilitada do hospedeiro, são usualmente denominados fungos oportunistas. Nestas circunstâncias podem produzir invasão da corrente sanguínea, trombo flebite, endocardite, infecções oculares e em praticamente qualquer órgão ou tecido quando introduzida por via intravenosa (Bassetti et al., 2006; Capoor et al., 2005; Laupland et al., 2005). *C. albicans* é considerada a espécie do gênero *Candida* mais frequentemente isolada e que apresenta mais fatores de virulência (Grimoud et al., 2003; Figueiredo et al. 2001; Jorge et al., 1997; Zöllner & Jorge, 2003). O objetivo do presente trabalho foi analisar a atividade inibitória do suco e de extratos aquosos e hidroalcoólicos do carpo, bagaço e casca de *Citrus aurantifolia* sobre *Candida albicans*.

Material e métodos

Frutos de *Citrus aurantifolia* (lima da Pérsia) foram colhidos em uma fazenda de Natividade da Serra – SP e processados no laboratório de Microbiologia da UNITAU. Preparo dos extratos:

Três quilos de *Citrus aurantifolia* foram lavados em água corrente com auxílio de

escova, higienizadas em solução de hipoclorito de sódio (200 ppm) por 15 minutos e enxaguadas em água corrente para a remoção de resíduos do hipoclorito.

Depois de higienizados, os frutos foram descascados com uma faca esterilizada e a casca separada em Becker esterilizado.

Dois quilos do fruto descascado tiveram seus grumos cortados ao meio, para separação do carpo e bagaço que foram reservados em Beckers esterilizados, um quilo do bagaço e da casca foi seco em estufa a 45 °C por cinco dias e o restante congelado. A polpa e o suco foram congelados até o preparo dos extratos.

Extrato hidroalcoólico:

Para cada parte retirada do fruto, 50g foram misturadas, em frasco âmbar esterilizado, a 250 mL de álcool etílico 80% e agitados vigorosamente por três minutos. Esta agitação foi realizada cinco vezes por dia durante 12 dias (Landucci, 2005).

Álcool etílico na concentração de 80% foi adicionado a um recipiente âmbar esterilizado e foi submetido à agitação vigorosa por três minutos, cinco vezes ao dia durante 12 dias (controle).

Preparo dos meios adicionados de extrato:

Após esse período, a tubos de ensaio foi adicionado 0,76g de agar Müller-Hinton, água destilada e extrato em quantidades suficientes para que, 20 mL de meio pronto, atingisse concentrações de 20, 15, 10, 5, 2,5, 1 e 0,5% (Figura 1). Os meios, em tubos, foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos e então vertidos em placas de Petri.

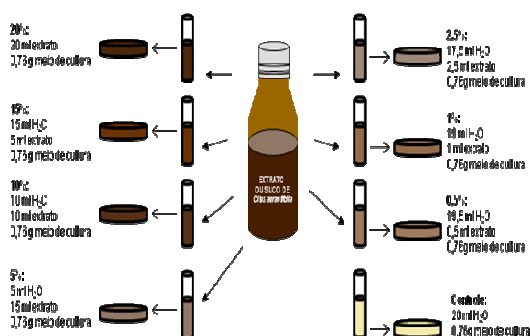


Figura 1 – Preparo dos meios de cultura adicionados de extratos e de *Citrus aurantifolia* em diversas concentrações

O mesmo procedimento foi repetido, entretanto, após o pH ter sido medido. Foram ainda preparados meios

adicionados com álcool 80% nas mesmas proporções utilizadas para o extrato hidroalcoólico e meios sem adição de extratos para controle do crescimento microbiano.

Todos os meios foram preparados em duplicata.

Com 24 h de antecedência, 25 cepas de *Staphylococcus aureus*, oriundas da coleção de culturas da Universidade de Taubaté (CCUT) e American Type Culture Collection (ATCC), foram reativadas em agar BHI.

Análise de atividade inibitória:

Após incubação por 24 h a 37 °C, para cada cepa foi preparada uma suspensão em 10 mL de solução salina (NaCl a 0,9%) esterilizada, compatível ao padrão 1 da escala de MacFarland (10⁶ cél/mL).

Com auxílio de pipeta automática, as suspensões foram transferidas para um repicador de Steers para serem semeadas nas placas previamente preparadas.

Depois de incubadas a 37 °C por 24h, a leitura foi realizada observando-se a presença ou ausência de crescimento no meio.

Resultados

Todos os meios contendo extrato, álcool controle ou suco não necessitaram de correção, pois apresentaram pH 7,0. Os meios contendo extrato hidroalcoólico demonstraram potencial inibitório à partir de 2,5% de concentração, no caso da casca e suco sobre *C. albicans* conforme mostrado na tabela 1.

Tabela 1: Percentual de cepas de *S. aureus* inibidas após 24h em meios contendo extratos hidroalcoólicos

Extrato	Percentual de inibição					
	0,5%	1%	2,5%	5%	10%	15%
Álcool Controle	0	0	0	0	0	100
Casca	0	0	100	100	100	100
Suco	0	0	44	100	100	100
Bagaço	0	0	0	100	100	100
Carpo	0	0	0	100	100	100

Discussão

A partir de 15% todas as cepas foram inibidas pelo álcool, demonstrando potencial seu inibitório (álcool controle), porém abaixo destas concentrações

observou-se potencial inibitório das partes do fruto de *Citrus aurantifolia*.

Ao contrário do estudo de Onyeagba et al. (2004), onde o suco de lima da pérsia não demonstrou potencial inibitório sobre *C. albicans*, o extrato hidroalcoólico do suco, do presente trabalho, foi capaz de inibir 100% das cepas de *C. albicans* na concentração de 5%, sendo que destas, 44% haviam sido inibidas na concentração de 2,5%.

Estudos de Johann et al. (2007) com três fungos fitopatogênicos (*Penicillium digitatum*, *Colletotrichum* spp. e *Curvularia* spp.) e duas espécies patogênicas para seres humanos (*Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum canis*), evidenciaram que extratos de hexano das cascas de *C. aurantifolia* possuem dois flavonóides polimetoxilados, que quando misturados, possuem capacidade de inibir esses fungos, porém a atividade é discreta em micro-diluições. No presente estudo as cepas da levedura *C. albicans* foram inibidas em extratos hidroalcoólicos da casca, podendo ter tido este efeito devido aos flavonóides citados no estudo de Johann et al. (2007)

Conclusão

Extratos hidroalcoólicos de carpo, casca, suco e bagaço de *Citrus aurantifolia* demonstraram potencial inibitório sobre *Candida albicans*.

Agradecimentos

Programa de Iniciação Científica UNITAU, funcionários do laboratório de microbiologia.

Referências

AMORIM, D.D. et al. Caracterização físico-química de lima-da-pérsia cultivada no leste de minas gerais. In **XX Congresso Brasileiro de Fruticultura**. Out. 2008.

BASSETTI, M. et al. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. **BMC Infect Dis**, v.10, n.6, p.6-21, 2006.

CAPOOR, M.R. et al. Emergence of non-albicans *Candida* species and antifungal resistance in tertiary care hospital. **Jpn J Infect Dis**, v.58, n.6, p.8-344, 2005.

FIGUEIREDO, R.L.Q. et al. Estudo microbiológico da prevalência de enterobactérias na cavidade bucal de pacientes HIV positivos e sua relação com o gênero *Candida*. **J Bras Clin Est Odontol**, v.5, n.26.

GHARAGOZLOO, M. et al. Effects of *Citrus aurantifolia* concentrated extract on the spontaneous proliferation of MDA-MB-453 and RPMI-8866 tumor cell lines. **Phytomedicine**. V9. p. 475-477. 2002.

GRIMOUD, A.M. et al. Colonization of the oral cavity by *Candida* species: risk factors in long-term geriatric care. **J Oral Sci**, v.45, n.1, 2003.

JOHANN, S. et al. Complete H and C NMR assignments and antifungal activity of two 8-hydroxy flavonoids in mixture. In **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 79, n. 2, p. 215-222. Brasil. 2007

JOHANN, S. et al. Antimicrobial activity of wax and hexane extracts from *Citrus* spp. peels. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 102, n. 6, p. 681-685. Rio de Janeiro, Brazil. September 2007.

JORGE, A.O.C. et al. Presença de leveduras do gênero *Candida* na saliva de pacientes com diferentes fatores predisponentes e de indivíduos controle. **Rev Odontol Univ**, São Paulo, v.11, n.4, p.85-279, 1997.

LANDUCCI, L.F. Atividade inibitória de extratos vegetais do cerrado brasileiro sobre microrganismos bucais. 2005. 105F. Tese (doutorado em biopatologia bucal, area biopatologia bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos.

LAUPLAND, K.B. et al. Invasive *Candida* species infections: a 5 year population-based assessment. **J Antimicrob Chemother**, v.56, n.3, 2005.

ONYEAGBA, R.A. et al. Studies on the antimicrobial effects of garlic (*Allium sativum* Linn), ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and lime (*Citrus aurantifolia* Linn). **African Journal of Biotechnology**. v. 3, n. 10, p. 552-554. Oct. 2004.

XIV INIC

Encontro Latino Americano
de Iniciação Científica

X EPG

Encontro Latino Americano
de Pós Graduação

IV INIC Jr

Encontro Latino Americano
de Iniciação Científica Júnior

UENO, M., JORGE, A.O.C. Bacilos Gram-negativos. In: JORGE AOC. **Princípios de microbiologia e imunologia**. São Paulo: Ed. Santos. p.65-84, 2006.

ZÖLLNER, M.S.C, JORGE, A.O.C. *Candida* spp. occurrence in oral cavities of breastfeeding infants and their mother's mouths and breasts. **Braz Oral Res**, v.17, n.2, 2003.