

Potencial antifúngico da fase clorofórmica de *Raphiodon echinus* contra *Candida tropicalis*

Maelle Santos Araújo^{1a}, Maria Alice Araújo de Medeiros^{2b}, Millena de Souza Alves^{2c*}, Bernadete Santos^{2d}, Aleson Pereira de Sousa^{3e}, Heloisa Mara Batista Fernandes de Oliveira^{4f}, Edeltrudes de Oliveira Lima^{5g}, Gabriela Lemos de Azevedo Maia^{6h}, Abrahão Alves de Oliveira Filho¹ⁱ

¹ Universidade Federal de Campina Grande, Patos-PB, Brasil.

² Programa de Pós-graduação em Ciência e Saúde Animal, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos-PB, Brasil.

³ Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, Brasil.

⁴ Hospital Universitário Ana Bezerra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Santa Cruz – RN, Brasil.

⁵ Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, Brasil.

⁶ Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina-PE, Brasil.

Correios eletrônicos:

^a araujomaelle@hotmail.com

^b medeirosallice22@gmail.com

^c millenaasouzaa@gmail.com

^d bernadetes672@gmail.com

^e aleson_155@hotmail.com

^f Heloisambf@gmail.com

^g edelolima@yahoo.com.br

^h gabriela.lam@gmail.com

ⁱ Abrahaol.alves@professor.ufcg.edu.br

Recebido: 3 de março de 2022

Revisado: 27 de fevereiro de 2023

Aceto: 2 de março de 2023

RESUMO

Introdução: *Candida tropicalis* é um agente frequente de candidemia em hospitais brasileiros, sendo a segunda espécie mais comumente isolada. A infecção por esse agente pode ocorrer em pacientes de todas as idades, mas acomete pacientes adultos e idosos com maior frequência. As candidemias estão relacionados aos animais. Consequentemente, os fármacos que afetam as células fúngicas também podem afetar as células humanas, fato que torna difícil o tratamento das infecções fúngicas. O aumento da resistência a antifúngicos alerta para a necessidade da ampliação de estratégias que impeçam a sua dispersão entre os fungos, como já aconteceu com as bactérias, que se depara distribuída e fora de controle. Por isso, é necessário, novas formas de estudos sobre alternativas terapêuticas, os fitoterápicos podem ser utilizados como nova opção de tratamento. **Objetivo:** determinar a concentração inibitória mínima da fase clorofórmica de *Raphiodon echinus* sobre cepas de *Candida tropicalis*. **Metodologia:** utilizou-se o método de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) sobre a técnica de microdiluição em caldo. **Resultados:** obteve-se uma CIM50 de 256 µg/mL para as cepas do fungo. **Conclusão:** dessa maneira, pode-se observar a possível utilização desta substância para posteriores tratamentos das doenças originadas pelas leveduras de *Candida tropicalis*.

Palavras-chave: Micologia, fitoterapia, *Candida tropicalis*.

SUMMARY

Antifungal potential of the chloroform phase of *Raphiodon echinus* against *Candida tropicalis*

Introduction: *Candida tropicalis* is a frequent agent of candidemia in Brazilian hospitals, being the second most commonly isolated species. Infection by this agent can occur in patients of all ages, but it affects adult and elderly patients more frequently. Candidemias are related to animals. Consequently, drugs that affect fungal cells can also affect human cells, making it difficult to treat fungal infections. The increase in resistance to antifungals alerts to the need to expand strategies that prevent their dispersion among fungi, as has already happened with bacteria, which are found to be distributed and out of control. Therefore, new forms of studies on therapeutic alternatives are necessary, herbal medicines can be used as a new treatment option. **Objective:** to determine the minimum inhibitory concentration of the chloroform phase of *Raphiodon echinus* on *Candida tropicalis* strains. **Method:**

dology: the method of determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was used on the broth microdilution technique. **Results:** a MIC₅₀ of 256 µg/mL was obtained for the fungus strains. **Conclusion:** in this way, it is possible to observe the possible use of this substance for further treatment of diseases caused by *Candida tropicalis* yeasts.

Keywords: Mycology, phytotherapy, *Candida tropicalis*.

RESUMEN

Potencial antifúngico de la fase clorofórmica de *Raphiodon echinus* frente a *Candida tropicalis*

Introducción: *Candida tropicalis* es un agente frecuente de candidemia en los hospitales brasileños, siendo la segunda especie más comúnmente aislada. La infección por este agente puede ocurrir en pacientes de todas las edades, pero afecta con mayor frecuencia a pacientes adultos y ancianos. Las candidemias están relacionadas con los animales. En consecuencia, los medicamentos que afectan a las células fúngicas también pueden afectar a las células humanas, lo que dificulta el tratamiento de las infecciones fúngicas. El aumento de la resistencia a los antifúngicos alerta sobre la necesidad de ampliar estrategias que eviten su dispersión entre los hongos, como ya ha ocurrido con las bacterias, que se encuentran distribuidas y fuera de control. Por lo tanto, son necesarias nuevas formas de estudios sobre alternativas terapéuticas, los medicamentos a base de hierbas pueden ser utilizados como una nueva opción de tratamiento. **Objetivo:** determinar la concentración inhibitoria mínima de la fase cloroformo de *Raphiodon echinus* sobre cepas de *Candida tropicalis*. **Método-logía:** se utilizó el método de determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) sobre la técnica de microdilución en caldo. **Resultados:** se obtuvo una CIM₅₀ de 256 µg/mL para las cepas del hongo. **Conclusión:** de esta manera, es posible observar el posible uso de esta sustancia para el tratamiento posterior de enfermedades causadas por levaduras *Candida tropicalis*.

Palabras clave: Micología, fitoterapia, *Cándida tropicalis*.

INTRODUÇÃO

Candida tropicalis é um agente frequente de candidemia em hospitais brasileiros, sendo a segunda espécie mais comumente isolada. A infecção por esse agente pode ocorrer em pacientes de todas as idades, mas acomete pacientes adultos e idosos com maior frequência [1].

O aumento da resistência a antifúngicos alerta para a necessidade do desenvolvimento de estratégias que evitem a sua disseminação entre os fungos, como já ocorreu com as bactérias, que se encontra disseminada e fora de controle [2]. A resistência aos azólicos em cepas de *Candida tropicalis* é devido ao aumento da expressão do gene ERG11, associada com uma mutação missense nesse gene [3].

Os medicamentos fitoterápicos têm sido um recurso para a saúde do ser humano. Durante milênios, o homem enraizou seus conhecimentos a fim da procura por melhorias nas condições de alimentação e cura de suas enfermidades [4].

As plantas medicinais são importantes por fornecerem matéria-prima para a síntese de drogas, além de serem utilizadas como agentes terapêuticos alternativos. O emprego das plantas é supervalorizado no uso tradicional com base nos seus benefícios medicinais. Dessa forma, torna-se imprescindível o conhecimento sobre a dose e a parte empregada da planta, além de suas propriedades terapêuticas, pois existem aquelas que são altamente tóxicas, mesmo em pequenas doses [5].

A família Lamiaceae é composta por aproximadamente 240 gêneros e 7200 espécies, ocorrendo em todo o mundo desde regiões tropicais até áreas de clima temperado, com exceção da Antártida. No Brasil, são encontrados 32 gêneros e 496 espécies, sendo muitas destas espécies endêmicas do semiárido nordestino, com destaque para o gênero *Hyptis* e *Raphiodon* [6].

Dentre os representantes da família Lamiaceae na Caatinga, pode-se destacar o gênero *Raphiodon*, representado pela espécie *Raphiodon echinus* e considerado como característico dessa região [7]. *Raphiodon echinus* é uma Lamiaceae rasteira, cuja distribuição é registrada nos estados de Bahia, Pernambuco, Paraíba, Ceará e Minas Gerais [8].

O presente estudo teve como objetivo determinar a concentração inibitória mínima da fase clorofórmica de *Raphiodon echinus* sobre cepas de *Candida tropicalis*.

METODOLOGIA

A fase clorofórmica de *Raphiodon echinus* foi cedido pela equipe da professora Dr. Gabriela Lemos de Azevedo Maia-Univasf. Para atingir os testes farmacológicos, a

substância foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) e em água destilada. A concentração de DMSO foi inferior a 0,1% v/v.

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A atividade antifúngica foi realizada em cinco cepas selecionadas de *Candida tropicalis* ATCC 13803, CT 14, LM 31, LM 36. Todas as cepas de microrganismos utilizados neste estudo fazem parte da MICOTECA do Laboratório de Micologia/DFP/CCS/UFPB.

A atividade antifúngica foi realizada de acordo com os protocolos descritos por Cleeland e Squires (1991) [9], Hadacek e Greger (2000) [10] e CSLI (2008) [11].

As CIMs do *Raphiodon echinus* foram determinadas contra cepas de *Candida tropicalis* pela técnica de microdiluição em caldo. Inicialmente, 100 µL de caldo de dextrose Sabouraud foram adicionados aos poços da placa de petri com 96 poços e fundo em "U". Em seguida, 100 µL dos produtos da emulsão foram dispensados nos poços da primeira fila da placa. Uma razão de duas concentrações foram obtidas de 1024 µg/mL a 2 µg/mL, de modo que a primeira linha da placa encontrasse a maior concentração e, por último, a menor concentração. Finalmente, 10 µL do inóculo foram adicionados às cavidades, onde cada coluna de placa se referiu a uma cepa fúngica, em particular.

Paralelamente, foi realizado o controle de viabilidade das cepas testadas, juntamente com o controle de sensibilidade, essas cepas de ação antifúngica consideradas padrões em uso clínico (Nistatina 100 UI/mL). Para verificar a ausência de interferência do solvente nos resultados, um controle foi colocado nas cavidades 100 µL do caldo duplamente concentrado, 100 µL de *Raphiodon echinus* e 10 µL da suspensão foi feita.

As placas foram seladas assepticamente e incubadas a 35 °C durante 24 - 48 horas. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento fúngico. O teste foi realizado em duplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CIMs obtidas nos dois testes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da CIM (Concentração inibitória mínima) de *Raphiodon echinus* contra as cepas de *Candida tropicalis* são mostradas na tabela 1. Para o teste de microdiluição em caldo, a fase clorofórmica de *Raphiodon echinus* apresentou CIM50 de 256 µg/mL para as cepas do fungo.

Sartoratto *et al.* (2004) [12] sugerem que uma atividade antimicrobiana é classificada como forte quando possuem CIM de até 500 µg/mL, moderada para CIM de 600 a

Tabela 1. Atividade antifúngica para determinação da CIM da fase clorofórmica do *Raphiodon echinus* contra cepas de *Candida tropicalis*.

Substância/cepa	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	<i>Candida tropicalis</i> LM 14	<i>Candida tropicalis</i> LM 31	<i>Candida tropicalis</i> LM 36
1024 µg/mL	+	+	+	+
512 µg/mL	-	+	+	+
256 µg/mL	-	-	+	+
128 µg/mL	-	-	-	-
64 µg/mL	-	-	-	-
32 µg/mL	-	-	-	-
16 µg/mL	-	-	-	-
Controle positivo	+	+	+	+
Controle negativo	-	-	-	-

(-) Nenhuma inibição (+) Inibição

1500 µg/mL e fraca para CIM acima de 1500 µg/mL. Sendo assim, de acordo com os resultados da fase clorofórmica de *Raphiodon echinus*, pode ser considerado forte inibidor frente às cepas *Candida tropicalis*.

Entre os representantes da família Lamiaceae na Caatinga, destaca-se o gênero *Raphiodon*, monotípico, representado pela espécie *Raphiodon echinus* (Nees & Mart) Schauer é considerado como característico dessa região [7]. Esta espécie se destaca por apresentar como principais características a presença de cálice frutífero com lacínios espinoscentes e hábito prostrado.

Além disso, *R. echinus* é tida como invasora, típica da caatinga, sendo encontrada especialmente em áreas sujeitas a inundação temporária, à beira da estrada e em áreas de cultivo abandonadas e apresenta diversa distribuição no Brasil, sendo registrada nos Estados de Bahia, Pernambuco, Paraíba, Ceará e Minas Gerais [13-16]. Em estudos realizados para a região Nordeste, *R. echinus* é citado em levantamentos feitos em Pernambuco [16], Paraíba [17] e Bahia [15].

Costa *et al.* (2017) [18] verificaram a capacidade antifúngica dos extratos de *R. echinus* contra cepas de diferentes espécies de *Candida* e observaram o efeito modulador destes extratos quando conjugados a antifúngicos sintéticos.

Pio *et al.* (2018) [19] realizou uma busca acerca dos conhecimentos e usos de plantas medicinais dos habitantes das ilhas do rio São Francisco. *R. echinus* apresentou-se como a planta, cujos efeitos e propriedades, eram mais conhecidos e usados corretamente pela população. No mesmo estudo foram avaliados os efeitos antimicrobianos

dos extratos aquoso e etanólico de *R. echinus* por meio da técnica de microdiluição, contra cepas bacterianas. Foi possível observar que o extrato aquoso não apresentou efeito desejável sobre as cepas bacterianas, entretanto o extrato etanólico de *R. echinus* apresentou efeito moderado. A fração acetato de etila do extrato etanólico, apresentou forte potencial antibacteriano sobre as cepas estudadas.

Duarte *et al.* (2016) [20] testaram as propriedades moduladoras do óleo essencial de *R. echinus* quando associado a antimicrobianos, contra cepas fúngicas de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e cepas bacterianas de *E. coli*, *S. aureus* e *Pseudomonas*. No estudo foi verificado uma reduzida atividade antifúngica e antibacteriana do óleo essencial, mas um forte efeito modulador quando associado aos antimicrobianos. Segundo os pesquisadores, o óleo essencial também apresenta uma forte atividade quelante de ferro.

Segundo um estudo realizado por Ferreira *et al.* (2019) [21], verificou-se que o do extrato aquoso e etanólico de *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (Lamiaceae) apresenta um forte efeito antifúngico contra cepas de *C. tropicalis*. Desta forma, sugere-se que este composto pode ser utilizado como uma alternativa terapêutica para o combate de infecções causadas por esse fungo.

CONCLUSÃO

Com a concretização desta pesquisa, pode-se compreender a abundante atividade antifúngica de *Raphiodon echinus* diante as cepas da espécie *Candida tropicalis*. Através da análise dos resultados, foi possível verificar que o produto natural testado proporcionou um forte efeito antifúngico sobre as cepas de *Candida tropicalis* em relação as cepas de origem clínica. Dessa maneira, pode-se observar a possível utilização desta substância para posteriores tratamentos das doenças originadas pelas leveduras de *Candida tropicalis*, destacando assim a obrigação de mais estudos para delinear esta atividade farmacológica.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. M. Nucci, A.L. Colombo, Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **58**(1), 77-82 (2007).

2. M.M. Canuto, F.G. Rodero, Antifungal drug resistance to azoles and polyenes, *Lancet Infect. Dis.*, **2**(9), 550-563 (2002).
3. P. Vandeputte, G. Larcher, T. Bergés, G. Renier, D. Chabaise, J. P. Bouchara, Mechanisms of azole resistance in clinical isolate of *Candida tropicalis*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**(11), 4608-4615 (2005).
4. F.R. Moreira, F.Q. Oliveira, Levantamento de plantas medicinais e fitoterápicos utilizados na comunidade quilombola - pontinha de paraopeba, Minas Gerais, Brasil, *Rev. Bras. Cienc. Vida*, **5**(5), Art 7, 1-24(2017).
5. J. Zhan, P. Zhou, A simplified method to evaluate the acute toxicity of ricin and ricinus agglutinin. *Toxicology*, **186**(1-2), 119-123 (2003).
6. R.M. Harley, Checklist and key of genera and species of the Lamiaceae of the Brazilian Amazon, *Rodriguésia*, **63**(1), 129-144 (2012).
7. R. Harley, In search of Labiate in Eastern Brazil, *Vitex*, **1**, 5-7 (2000).
8. C.T.V. Dias, L.H.P. Kill, Ecologia da polinização de *Raphiodon echinus* (Nees & Mart.) Schauer (Lamiaceae) em Petrolina, PE, Brasil, *Acta Bot. Bras.*, **21**(4), 977-982 (2007).
9. R. Cleland, E. Squires, Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections, em: V. Lorian (editor), *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 3rd ed., Williams & Wilkins, New York (NY), 1991, pp. 739-788.
10. F. Hadacek, H. Greger, Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice, *Phytochem. Anal.*, **11**, 137-147 (2000).
11. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Standard-Second Edition*, CLSI document M27-A3, Wayne (PA), 2008.
12. A. Sartoratto, A.L.M. Machado, C. Delarmelina, G.M. Figueira, M.C.T. Duarte, V.L.G. Rehder, Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil, *Braz. J. Microbiol.*, **35**, 275-280 (2004).
13. R.M. Harley, Evolution and distribution of Eriope (Labiatae) and its relatives in Brasil, em: *Proceedings of a workshop on Neotropical Distribution Patterns*, Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 1988, pp. 71-80.
14. R.M. Harley, B.L. Stannard, *Flora of the Pico das Almas, Chapada Diamantina, Bahia, Brazil*, Royal Botanic Gardens, Bahia, 1995, 877 p.

15. R.M. Harley, The Labiateae of Bahia: A preliminary checklist, *Sitientibus*, **15**, 11-21 (1996).
16. U.P. Albuquerque, C.F.C.B.R. Almeida, Diversidade da família Labiateae em Pernambuco, em: M. Tabarelli, J.M.C. Silva (orgs.), *Diagnóstico da Diversidade de Pernambuco*, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente, Recife, 2002, pp. 295-304.
17. M.R.V. Barbosa, M.F. Agra, E.V.S.B. Sampaio, J.P. Cunha, L.A. Andrade, Diversidade Florística na Mata do Pau-Ferro, Areia, Paraíba, em: M. Tabarelli, J.J.P. Cabral, K.C. Porto (orgs.), *Brejos de altitude em Pernambuco e Paraíba: história natural, ecologia e conservação*, (Série Biodiversidade, 9), Brasília, 2004, pp. 111-122.
18. A.R. Costa, J.L. Silva, K.R. Lima, M.I. Rocha, L.M. Barros, J.G.M. Da Costa, H.D.M. Coutinho, *Rhaphiodon echinus* (Nees & Mart.) Schauer: Chemical, toxicological activity and increased antibiotic activity of antifungal drug activity and antibacterial, *Microb. Pathog.*, **107**, 280-286 (2017).
19. I.D.S.L. Pio, A.L. Lavor, C.M.D. Damasceno, P.M.N. Menezes, F.S. Silva, G.L.A. Maia, Traditional knowledge and uses of medicinal plants by the inhabitants of the islands of the São Francisco River, Brazil and preliminary analysis of *Rhaphiodon echinus* (Lamiaceae), *Braz. J. Biol.*, **79**, 87-99 (2018).
20. A. Duarte, I.R.A. De Menezes, M.F.B.M. Braga, N.F. Leite, L.M. Barros, E.P. Waczuk, M.E. Burguer, Antimicrobial activity and modulatory effect of essential oil from the leaf of *Rhaphiodon echinus* (Nees & Mart) Schauer on some antimicrobial drugs, *Molecules*, **21**(6), 743 (2016).
21. J.L.S. Ferreira, J.N.M. Cavalcante, D.S. Siqueira, R.V. Bezerra, L.A. Delgado, H.M.B.F. De Oliveira, A.O. Filho, Comparação da atividade antifúngica do extrato aquoso e do extrato etanólico de *Rhaphiodon echinus* (lamiaceae) contra cepas *Candida tropicalis*, *Rev. UNINGÁ*, **56**(3), 1-8 (2019).

COMO CITAR ESTE ARTIGO

m. Santos-Araújo, M.A. Araújo de Medeiros, M. de Souza-Alves, B. Santos, A. Pereira de Sousa, H.M.B. Fernandes de Oliveira, E. de Oliveira-Lima, G.L. de Azevedo-Maia, A.A. de Oliveira Filho, Potencial antifúngico da fase clorofórmica de *Raphiodon echinus* contra *Candida tropicalis*, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **52**(1), 555-563 (2023). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v52n1.101478>