

ATIVIDADE DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Combretum lanceolatum* Pohl ex Eichler CONTRA ESPÉCIES DO GÊNERO *Candida*

Christian Gabriel da Luz¹, Alison dos Santos Santana¹, Cristina de Andrade Monteiro², Flavia de Aquino Cutrim Farias², Yrla Nívea Oliveira Magalhães³

1. Estudantes do Curso de Licenciatura de Ciências Biológicas do IFMA, do Campus São Luís Monte Castelo. Emails: g.luz@acad.ifma.edu.br e alisonsantana@acad.ifma.edu.br

2. Doutora. Docente do Curso de Licenciatura de Ciências Biológicas do IFMA, do Campus São Luís Monte Castelo. Email: cristinamonteiro@ifma.edu.br e flavia_cutrim@ifma.edu.br

3. Doutora. Coordenadora. Docente do Curso de Licenciatura de Ciências Biológicas do IFMA, do Campus São Luís Monte Castelo. E-mail: yrlanivea@ifma.edu.br

RESUMO

A candidíase vulvovaginal é uma infecção muito comum causada por fungos do tipo leveduras do gênero *Candida*. Seu tratamento necessita de uma atenção maior, pois caso não receba a atenção e os cuidados necessários, pode acarretar outros problemas de saúde para as mulheres. As infecções causadas por essas espécies de leveduras têm sido recorrentes nos últimos anos, devido à resistência aos principais ativos utilizados para combater esses fungos. Por esse motivo é necessário buscar novas formas de combater esses micro-organismos causadores dessas infecções. Nesse sentido, este estudo tem a finalidade de investigar a atividade antifúngica da planta *Combretum lanceolatum* (pombeiro vermelho) a partir do extrato etanólico obtido de folhas e galhos. Os extratos foram testados em linhagens de *Candida* a fim de avaliar sua ação antifúngica com o objetivo de obter um produto que possa ser utilizado no tratamento da candidíase. O extrato etanólico dos galhos (EECLG) mostrou-se mais eficiente, com valores de CIM variando entre 3,9 µg/mL e 125 µg/mL, especialmente contra *Candida albicans*. A concentração inibitória mínima (CIM) de 11,7 µg/mL foi obtida com *C. albicans* IC-CA03 isolada em ensaios clínicos, sugerindo potencial terapêutico promissor, considerando a resistência crescente de fungos como *Candida albicans* a antifúngicos comerciais. Esses resultados corroboram o uso de espécies do gênero *Combretum* como alternativas naturais no tratamento de infecções fúngicas.

Palavras-Chaves: Biotecnologia; Produtos naturais; Ação antifúngica, *Candida*

Orgão financiador: FAPEMA

INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Candida* apresentam estrutura celular característica dos seres vivos do Reino Fungi, que inclui parede celular de quitina e membrana citoplasmática fosfolipídica, constituída por proteínas que agem como enzimas, e o ergosterol. Em condições ótimas de crescimento, com nutrientes específicos e temperatura ideal, crescem exponencialmente em forma de blastoconídios (MODRZEWSKA; KURNATOWSKI, 2013).

Dos fungos leveduriformes responsáveis por causar doenças em humanos, as espécies pertencentes ao gênero *Candida* aparecem em destaque (SILVA et al., 2012). *C. albicans* é uma espécie prevalente em infecções causadas por este gênero. No entanto, o número de relatos de infecções causadas por espécies de *Candida* não-albicans, como *C. glabrata* é crescente. O principal problema destas espécies é a alta incidência de infecções em adultos associada à elevada mortalidade, decorrente do aumento de microorganismos que apresentam resistência aos antifúngicos (PFALLER et al., 2010; CASTANHEIRA et al., 2016).

Atualmente houve um crescimento de leveduras resistentes do gênero *Candida* frente aos antifúngicos disponíveis no mercado. Isto faz com que haja necessidade de pesquisas em plantas, na busca de atividades antifúngicas (ABILIO, 2015).

Por esse motivo é necessário buscar novas formas de combater esses microorganismos causadores dessas infecções. O uso de plantas para tratamento de forma alternativas de doenças vem sendo uma prática muito comum no decorrer dos anos. Estudos afirmam que os extratos de algumas espécies de plantas possuem componentes antifúngicos que podem ser utilizados no tratamento da CVV.

Neste trabalho foi realizado a produção do Extrato Etanólico de *Combretum lanceolatum*. Logo após foi realizado o teste em meio líquido (microdiluição) em placa de 96 poços para determinar a concentração inibitória mínima (CIM).

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do Extrato Etanólico

A preparação do extrato etanólico será realizada através do método de maceração em etanol/água, pelo período de 10 dias, utilizando álcool etílico a 50%, sendo posteriormente filtrados e armazenados em frasco âmbar. Alíquotas serão secas a 55°C, até obtenção de pellets

que serão ressuspensos em 10 ml de DMSO 1% (Dimetilsulfóxido 1%), e posteriormente filtradas com microfiltro 22 µm (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

Microorganismos utilizados

Serão utilizadas duas amostras de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata* provenientes de secreção vaginal previamente identificadas e estocadas no Laboratório de Biologia do Instituto Federal do Maranhão. Os inóculos serão padronizados na escala 0,5 de McFarland correspondendo a uma concentração de 10⁶ células/mL.

Ensaio em meio sólido por difusão em Agar

Os ensaios de avaliação da atividade antifúngica dos extratos serão conduzidos através do método de difusão em Agar utilizando cavidades em placas. Serão inoculados, em placas de ágar Sabouraud com cloranfenicol (Becton Dickinson GmbH, Alemanha) 100 µl da solução padronizada com auxílio de swabs estéreis.

Serão feitos poços de 8 mm de diâmetro e adicionadas alíquotas de 50 µl dos extratos brutos em cada poço. O ensaio será realizado em duplicata e como controles serão utilizados o antifúngico Nistatina (128 mg ml⁻¹) e o solvente DMSO 1%. As placas serão incubadas por 48 horas a 37°C e após esse período será feita leitura dos diâmetros dos halos com auxílio de régua milimetrada.

Ensaio em meio líquido

O ensaio em meio líquido será realizado em microplacas de 96 poços de fundo chato. O extrato será diluído em meio RPMI na proporção de 1:1 ml. Em cada microplaca serão adicionados aos poços o extrato diluído e o inóculo (1:1, v:v). Além dos poços testes serão utilizados controles de meio e inóculo (1:1, v:v); extrato diluído e salina (1:1, v:v); fluconazol e inóculo (1:1, v:v); DMSO 1%, meio e inóculo (0,5:0,5:1, v:v:v).

As placas serão incubadas por 48h a 37 °C. Os testes serão feitos em triplicata e o resultado será obtido por quantificação da absorbância em leitor de microplacas (bioMérieux Reader 250 Version 2.0.5) no comprimento de onda de 450 nm. Os extratos que obtiveram resultados positivos serão submetidos à avaliação da concentração inibitória mínima (CIM).

Ensaio para determinar CIM (concentração inibitória mínima)

A concentração inibitória mínima dos extratos será determinada pelo ensaio de microdiluição em caldo de acordo com Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) padrão¹⁷. O inóculo padronizado na escala de 0.5 de McFarland será diluído na proporção de 1:50. Os ensaios serão realizados em placas de microtitulação de poliestireno com 96 poços.

Os extratos serão testados nas diluições de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 diluídos em meio RPMI e em seguida adicionados 100 µL de suspensão celular padrão. As microplacas serão incubadas a 37°C por 48 h e após esse período será feita leitura em leitor de ELISA (bioMérieux Reader 250 Version 2.0.5) a 450nm para determinar as CIMs.

As CIMs que apresentarão inibição serão semeadas com a ajuda de um swab estéril em placas de Ágar Sabouraud dextrosecloranfenicol para determinar se o extrato tem caráter fungicida ou fungistático.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obtenção de material vegetal

O material vegetal utilizado para a preparação dos extratos foram galhos e folhas da espécie *Combretum lanceolatum*, coletado em julho de 2021, no município de Campo Maior (Piauí, Brasil), nas coordenadas geográficas: S 04° 46' 03,5", W 42° 10' 49.9", altitude 101m.

A identificação botânica da espécie foi feita por uma especialista do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Piauí, com quem se mantém uma parceria.

Preparação dos extratos

O material vegetal oriundo dos galhos e folhas de *C. lanceolatum* (505 g) foi seco, a temperatura ambiente, moído em moinho de facas e submetido à maceração com etanol (95%) por seis vezes consecutivas (com eventuais agitações e sendo deixado em repouso por pelo menos 12 horas antes da retirada do sobrenadante por filtração simples), com intervalos de tempo de 72 horas, sucessivamente. O solvente orgânico foi removido em evaporador rotativo à pressão reduzida em aquecimento entre 40-50°C e a água residual foi removida por liofilização.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Inicialmente foram feitos testes para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) com linhagens de bactérias (*Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213) e leveduras (*Candida albicans* ATCC 90028 e *Candida krusei* ATCC 6258) de referência para se verificar o potencial de ação do extrato.

A tabela 1 mostra que os valores da CIM do extrato etanólico produzido a partir dos galhos (EECLG) variaram de 3,9 a 125 µg/m, tendo melhor ação para as leveduras do que para bactérias.

Os valores da CIM para o extrato etanólico produzido a partir das folhas (EECLF) foram maiores, com valores entre 7,8 a 250 µg/mL, com melhor atividade para *C. albicans*.

Foram testadas frações preparadas após separação com solventes de diferentes polaridades a partir do EECLG. Destas, as frações aquosa, precipitado e acetato de etila tiveram maior inibição com valor de 125 µg/mL (Tabela 1).

Tabela 1. Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos etanólicos bruto de *Combretum lanceolatum* galhos (EECLG) e folhas (EECLF) e das frações (hexânica - FH; acetato de etila - AcOEt) do extrato dos galhos contra bactérias e leveduras de referência.

Cepas	Extratos µg/mL					
	Extrato etanólico		Frações – extrato etanólico (galhos)			
	EECLG	EECLF	CLG precipitado	CLG aquoso	CLG FH	CLG FAcOEt
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	62.5	250	500	500	250	500
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	125	250	250	250	250	250
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	3.9	7.8	125	125	250	125
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	15.6	250	125	125	250	125

O projeto de pesquisa envolve várias etapas e parcerias com outras instituições para obtenção do material vegetal utilizado. Em seis meses de execução do projeto foram realizadas as etapas de obtenção de material vegetal de *C. lanceolatum* e elaboração do extrato etanólico, além das frações hexânica, acetato de etila, aquosa e precipitado, com a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizando linhagens de bactérias de referência: *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, e leveduras de referência: *Candida albicans* ATCC 90028 e *Candida krusei* ATCC 6258, para que fosse avaliado o potencial de ação do extrato.

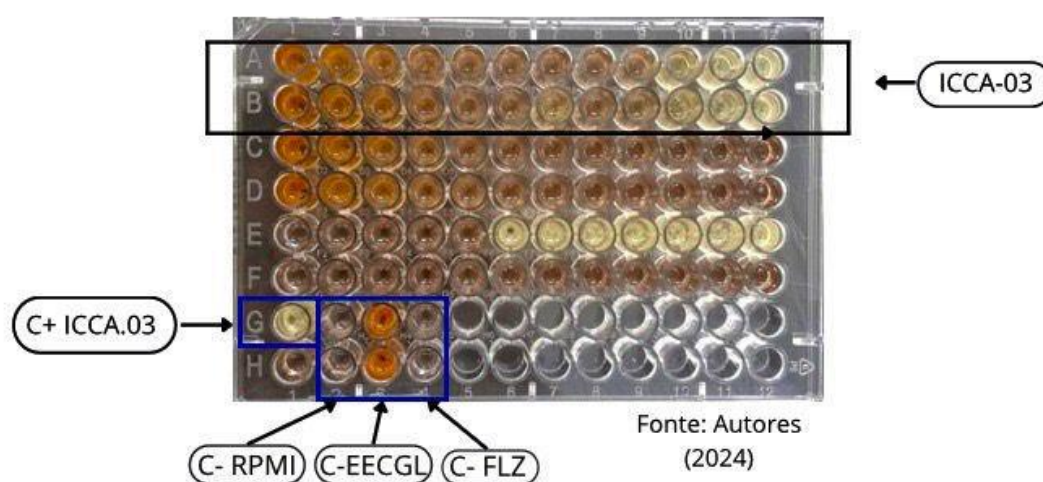
Tendo em vista a necessidade de obtenção dos extratos e frações e da obtenção e manutenção dos microorganismos testados, além do tempo necessário para a padronização das etapas, tem-se a necessidade de mais tempo para sua execução. Por isso, consideramos a

necessidade e a viabilidade para a renovação do projeto, principalmente no que diz respeito à elaboração de um produto farmacológico.

Determinação do CIM

A figura 1 mostra o ensaio em meio líquido RPMI com uma cepa clínica de *Candida albicans* IC-CA03 extraída de secreção vaginal, e com extrato etanólico de galho de *Combretum lanceolatum* (EECLG) para determinar o CIM. O teste resultou em uma concentração inibitória mínima de 11,7ug/mL.

Figura 1. Microdiluição em placa de 96 poços, para teste de eficácia do extrato de *Combretum lanceolatum* na concentração de 11, 7 ug/mL contra *Candida albicans*.



Sendo assim observou-se que concentração obtida no ensaio com a linhagem clínica foi superior a concentração inibitória mínima obtida pela mesma fração do extrato (EECLG) em uma linhagem ATCC de referência, no entanto vale ressaltar que a concentração obtida ainda foi baixa, considerando as outras frações preparadas anteriormente. O valor obtido é promissor considerando-se que alguns antifúngicos convencionais da indústria farmacêutica, como o Fluconazol, têm perdido eficácia contra *Candida albicans* e outras espécies do gênero (PAPPAS et al., 2016).

Muitas espécies do gênero *Combretum* são utilizadas na medicina popular da África. Geralmente são utilizadas todas as partes da planta para tratamento de diversos tipos de doenças como infecções microbianas, problemas psicológicos e doenças do coração (DAWE et al., 2013).

A espécie *Combretum caffrum* tem sido testada sua eficiência anticâncer, quando

tratadas com tubulina. As combrestatinas provenientes dessa espécie apresentam um valioso efeito antimitótico e antivascular, que se dá por conta da inibição da função dos microtúbulos que são alvos muito utilizados no tratamento do câncer (ARORA et al., 2013).

Foram realizados estudos por Nascimento-Neto et al (2015) que constataram o efeito cicatrizante de feridas em ratos, quando os mesmos foram tratados com uma concentração de 100 µg/m, com o extrato etanólico e o triterpeno 3β, 6β, 16β-trihidroxilup-20(29)-eno, ambos das folhas de *Combretum leprosum*.

Outras espécies do Gênero *Combretum* também foram testadas e apresentaram ação antidiabética, antifúngica, antiasmática, entre outras. Como foi o caso dos extratos testados da *Combretum erythrophyllum* que demonstraram ação antibacteriana em diferentes doses, contra *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureuse* e *Enterococcus faecalis*. Além disso, a atividade antifúngica foi avaliada contra as espécies *C. albicans*, *C. aeofromans*, *A. fumigatus*, *S. schenckii* e *M. canis* (DAWE et al., 2013).

Assim como as demais espécies de *Combretum*, a *Combretum lanceolatum* também apresentou atividade antifúngica. O composto utilizado (Extrato Etanólico), que é proveniente dos galhos da dessa planta, inibiu o crescimento da linhagem clínica *Candida albicans*.

CONCLUSÃO

O extrato Etanólico de *Combretum lanceolatum* (EECLG) apresentou atividade antifúngica contra a espécie levedura *C. albicans* ICCA-03, na concentração de 11,7ug/mL. Apresentando uma forma alternativa e acessível terapêutica para o tratamento de infecções causados por esse gênero de Levedura, da mesma forma que as demais espécies de *Combretum* descritas em outros trabalhos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a FAPEMA por ter financiado este trabalho; ao grupo de pesquisa LPBIOTEC, DAB-IFMA-MTC, onde são desenvolvidos os experimentos; ao Laboratório de Produtos Naturais da UFIP, pela parceria.

REFERÊNCIAS

ABÍLIO, V. M. F. et al. Atividade antifúngica de produtos naturais indicados por raizeiros

para tratamento de candidíase oral. Rev. Cub. Est., 51 (3): 259-269, 2014.

ARORA S.; GONZALEZ A. F.; SOLANKI, K. Combrestatin A-4 and its analogs in cancer Therapy. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review, 22(2), 168-174, 2013.

DAWE A.; PIERRE, S.; TSALA, D. E.; HABTEMARIAM, S. Phytochemical constituents of Combretum loefl (Combretaceae), Pharmaceutical Crops, 4, 38-59, 2013

NASCIMENTO-NETO, L.G.; EVARISTO, F. F. V.; ALVES, M. F. A.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; SANTOS, H. S. S.; BANDEIRA, P. N.; ARRUDA, F. V. S.; TEIXEIRA, E. H. Effect of the triterpene 3 β , 6 β , 16 β -trihydroxylup20(29)-ene isolated from leaves of Combretum leprosum Mart. On cutaneous wounds in mice. Journal of Ethnopharmacology, 171, 116-120, 2015.

PAPPAS, P. G.; et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA). Clinical Infectious Diseases, v. 62, n. 4, p. e1-e50, 2016.

MODRZEWSKA, B.; KURNATOWSKI, P. Selected pathogenic characteristics of fungi from the genus Candida. Annals Parasitology, 59(2), 57-66, 2013.

PFALLER, M. A. et al. The Global Antifungal Surveillance Group. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. Journal of Clinical Microbiology, 48, 1366-1377, 2010.

SILVA, S. L. et al. Onicomicoses por fungos do gênero *Candida*: uma revisão de literatura. Research, Society and Development, 9(8), e560985771. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i8.5771>; 2020.

.

