

POTENCIAL FUNGICIDA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Solanum acanthodes* HOOK. SOBRE *Candida albicans in vitro*

Mônica Amorim dos Santos

Acadêmica do curso de Biologia na Faculdade São Lucas.

Renato Abreu Lima

Doutorando em Biodiversidade e Biotecnologia na Universidade Federal do Amazonas – UFAM; E-mail: renatoabreu07@hotmail.com.

RESUMO: *Candida albicans* têm sido apontada como a principal espécie envolvida em infecções fúngicas da cavidade oral e possuem como principal fator de virulência a capacidade de adesão aos tecidos bucais e formação de biofilmes. *Solanum acanthodes* Hook tem ampla distribuição geográfica, sendo encontrada na Floresta Amazônica do Peru, Equador e Brasil. As folhas dessa espécie são utilizadas nas afecções das vias urinárias, colesterol, cólica renal, abdominal e diabete. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade fungicida do extrato etanólico das folhas de *S. acanthodes* sobre *C. albicans in vitro*. Para isto, discos de 5 mm de diâmetro de culturas de isolados do fungo foram colocados no centro de placas de Petri contendo meio (BDA), sendo que, na área periférica das placas, foram dispostos simetricamente quatro discos de papel-filtro, cada um com 1mL de extrato vegetal, extraído por maceração. Como controle positivo, utilizaram-se discos sem o extrato vegetal e como controle negativo, utilizaram-se discos com produto químico. O delineamento foi inteiramente casualizado, com três repetições (placas) por tratamento. A avaliação consistiu verificar o crescimento do fungo, a cada 24 horas, durante seis dias, medindo as colônias. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Verificou-se após 144 horas que o extrato etanólico das folhas de *S. acanthodes* apresentou resultado satisfatório na cepa de *C. albicans*, onde ocorreu inibição do crescimento do fungo (média 2,4) demonstrando maior espectro inibitório se comparado como o produto químico (média 3,4).

PALAVRAS-CHAVE: Fruta-do-Lobo; Extrato Vegetal; Candidíase.

FUNGICIDE POTENTIAL OF ETHANOL EXTRACT OF THE LEAVES OF *Solanum acanthodes* HOOK ON *Candida albicans* IN VITRO

ABSTRACT: *Candida albicans* is the main species in fungus infections of the mouth, with a high virulence featured by the adhesion capacity to mouth tissues and biofilm formation. *Solanum acanthodes* Hook has a wide geographic distribution and may be found in the Amazon forest of Peru, Ecuador and Brazil. Its leaves are used against infections of the urinary pathways, cholesterol, kidney and belly aches and diabetes. Current analysis evaluates the fungicide activity of the ethanol extract of the *S. acanthodes* leaves on *C. albicans* in vitro. Discs with a 5 mm-diameter of cultures isolated from the fungus were placed in the center of petri dishes with BDA medium; four filter paper discs, each with 1 mL of a vegetal extract by maceration were symmetrically placed on the periphery of the plates. Positive control consisted of discs without the vegetal extract, whereas negative control discs with a chemical product were used. The assay had a random design with three replications

(plates) per treatment. Fungus growth at every 24 hours during six days was evaluated by measuring the colonies. Data underwent analysis of variance and averages were compared by Tukey's test at 5%. After 144 hours ethanol extract of the *S. acanthodes* leaves had good results on *C. albicans* strain. Fungus growth was inhibited (average 2.4) with a higher inhibitory spectrum when compared to that of the chemical product (average 3.4).

KEY WORD: *Solanum acanthodes*; Vegetal Extract; Candidiasis.

INTRODUÇÃO

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana, tendo o conhecimento popular grande contribuição para divulgação das virtudes terapêuticas obtidas a partir do uso destas plantas. Assim, esse conhecimento representa, muitas vezes, um recurso terapêutico para muitas comunidades e grupos étnicos (MACIEL; PINTO; VEIG, 2002) que não dispõem de acesso a outros tratamentos disponíveis pela medicina ou que a preferem em relação à medicina tradicional por questões culturais.

Propriedades bioativas presentes em extratos e óleos essenciais, produzidos pelas plantas, como uma consequência do metabolismo secundário, mostraram-se eficientes no controle do crescimento de uma ampla variedade de microrganismos, incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias, o que evidencia o potencial das plantas no combate a esses organismos patogênicos (DUARTE, 2006).

A família Solanaceae é uma das maiores entre as Angiospermas existentes, com cerca de 2.300 espécies subordinadas a 96 gêneros. Sua distribuição geográfica está concentrada principalmente na América do Sul. No Brasil, ela apresenta grande diversidade e endemismo tendo sua ocorrência desde a Amazônia ao Sul do país, além de possuir várias espécies com atribuições ornamentais, medicinais e nutricionais (SOARES et al., 2007).

O gênero *Solanum* é composto por aproximadamente 1.000 a 3.700 espécies, sendo o principal gênero de Solanaceae e também um dos maiores entre as Angiospermas. Apresentam-se como

plantas invasoras, ocupando os mais diversos tipos de ambientes, desde lavouras e terrenos baldios a margens de rodovias. (CORDEIRO, 2008).

Solanum acanthodes Hook é popularmente conhecida como "fruta-do-lobo", sendo encontrada particularmente nas regiões equatoriais. São arbustos ou arvoretas, de 2 a 5 metros de altura com cerca de 10 cm de diâmetro, tronco com espinhos robustos e ramos e folhas geralmente com poucos espinhos (NEE, 2007).

Estudos comprovam que o Brasil possui uma grande biodiversidade mundial, com mais de espécies de plantas e animais, quase 19% da flora mundial se encontra, principalmente na Floresta Amazônica, que apresenta uma das mais ricas e diversificadas do mundo, das quais muitas destas plantas são pouco conhecidas em todos os seus aspectos (GIULIETTI et al, 2005).

Os fungos são seres encontrados nos mais diversos ambientes, tais como: vegetais, ar atmosférico, solo e água. As leveduras do gênero *Candida* são normalmente encontradas como membros da microbiota normal humana, podendo estar presentes nas mucosas da boca e dos trato digestivo, no genital urinário de indivíduos sadios, sendo capazes de desencadear o aparecimento de infecções, chamadas candidíases, principalmente em pessoas com fatores predisponentes (COWEN; ANDERSON; KOHN, 2002)

Candida albicans é o patógeno mais comum nas candidíases cutâneas e da orofaringe, porém as espécies não *albicans* têm aumentado em número e em importância nas candidíases vaginal e sistêmica (REX et al., 2000).

Diante das limitações de uso desses antifúngicos sintéticos, evidenciadas pelo aumento da resistência pelos microrganismos, bem como pelas reações indesejadas apresentadas pelos usuários, novos agentes são propostos na tentativa de minimizar tais ocorrências. Nesse sentido, considerando a ampla atividade biológica apresentada pelos produtos de origem natural, extratos vegetais obtidos a partir do gênero *Solanum* têm sido investigados para determinação da atividade antimicrobiana.

Considerando essa realidade, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica do extrato etanólico das folhas de *S. acanthodes* sobre *C. albicans* *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 A PLANTA E A PREPARAÇÃO DO EXTRATO

As folhas de *S. acanthodes* foram coletadas no BR 364 km 9,5, Coordenadas geográficas 10°51'03,0" de latitude sul e 037°09'31,0" de longitude oeste e altitude de 32 m, próximo da Universidade Federal de Rondônia, em Porto Velho - RO. A identificação botânica foi realizada pelo envio de uma exsicata ao Herbário Dr. Ary Tupinambá Penna Pinheiro da Faculdade São Lucas - HFSL, Rondônia, a qual se encontra registrada sob o Nº de 005180.

Após a coleta, as folhas foram pesadas frescas, obtendo 1.597g de material e, em seguida, colocadas para secar em temperatura ambiente por 72 horas. A extração foi realizada a partir das folhas devidamente secas e trituradas, obtendo-se 467,19g de material, sendo colocada em Erlenmeyer contendo três litros e 750 mL de etanol, por sete dias, em uma repetição. Posteriormente, o material foi filtrado e submetido ao processo de destilação em evaporador rotatório, resultando em aproximadamente 200 mL de extrato bruto das folhas de *S. acanthodes*.

2 CULTURA DO FUNGO *C. albicans*

No Laboratório de Microbiologia da Faculdade São Lucas foi utilizada a metodologia aplicada nos estudos de Santos et al. (2011), discos de 5 mm de diâmetro de culturas de isolados do fungo *C. albicans* (ATCC 10.231); foram colocados no centro de placas de Petri contendo meio Batata Dextrose Agar (BDA), sendo que, na área periférica das placas, foram dispostos simetricamente quatro discos de papel-filtro, que foram embebidos em 1mL de extrato vegetal durante 1 minuto, obtendo-se a 0,12mL de extrato para cada disco. Como controle positivo, utilizaram-se discos embebidos em água destilada e controle negativo, o produto químico Kasumin[®], ambos na concentração de 1mL. Após esse processo, as placas foram incubadas a 25°C durante seis dias. A avaliação consistiu em medir o diâmetro das colônias (média de duas medidas diametralmente opostas) iniciadas após 24

horas de incubação, perdurando os seis dias, ou seja, até o momento em que as colônias fúngicas do tratamento testemunha atingiram toda a superfície da placa. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento. Cada repetição foi constituída por uma placa de Petri.

O produto químico emulsificante Kasumin[®], um surfactante não iônico, fungicida, bactericida e antibiótico sistêmico vem sendo muito empregado como agente dispersante na preparação de soluções, produzindo um procedimento mais confiável na preparação do inóculo. Contudo, os surfactantes podem interagir com organismos e drogas afetando a atividade *in vitro* de agentes antimicrobianos. Nenhuma quantidade padrão desse agente tem sido empregada na maioria das publicações até agora (NASCIMENTO et al., 2008).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se que o extrato etanólico das folhas de *S. acanthodes* apresentou potencial fungicida sobre *C. albicans*, notando-se que, no final de 144 horas, a média de inibição das colônias dos fungos utilizando o extrato vegetal foi de 2,4; no controle positivo, utilizando-se a água destilada estéril, a média foi de 4,6, enquanto que no controle negativo, utilizando-se o produto químico, a inibição média foi de 3,4. Sendo que "a" diferiu estatisticamente a 100% de probabilidade, "aB" diferiu estatisticamente a 50%, e "C" não diferiu estatisticamente em comparação aos tratamentos testados (Tabela 1).

Tabela 1. Mortalidade média (mm) do fungo *C. albicans* submetidos à exposição do extrato vegetal das folhas de *S. acanthodes in vitro* durante 144 horas. Porto Velho - RO, 2012

Tratamentos	Horas						Médias
	24	48	72	96	120	144	
Extrato vegetal	1,0a	1,2a	1,4a	1,7a	2,1a	2,4a	1,63a
Produto químico	1,2a	1,6a	1,9a	2,4a	2,9a	3,4aB	2,23a
Água destilada	1,5a	2,4a	2,7a	3,3aB	3,7aB	4,6aB	3,03aB
Médias	1,23a	1,73a	2,00a	2,46a	2,9a	3,46aB	2,29a

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna, e mesma letra minúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

As plantas do gênero *Solanum* são conhecidas por possuírem em sua composição química principalmente alcaloides esteroidais, além de uma grande variedade de saponinas, sapogeninas, flavonoides e glicoalcaloides (VAZ, 2010; CORDEIRO, 2008), e esses metabólitos secundários são descritos na literatura por possuírem potencial biológico. Isso se assemelha com nossos resultados, que foram positivos quando utilizado extrato vegetal contra o microorganismo, possivelmente devido à presença de um ou combinação de vários metabólitos secundários.

Pires et al. (2009), ao realizar um estudo fitoquímico do caule de *S. acanthodes* com reagentes específicos para reconhecimento de alcaloides (Mayer, Wagner e Dragendorff), glicosídeos cardiotônicos (Salkowski, Kedde, Keller-Killiani e Liebermann Burchard), de cumarinas voláteis, flavonoides, taninos (acetato de chumbo e cloreto de ferro III) saponinas, triterpenos (Liebermann-Burchard e Salkowski) e derivados antracênicos livres (Börntraeger), verificaram que os resultados obtidos foram positivos para alcaloides, triterpenos, flavonoides e saponinas. Além disso, foram encontrados glicosídeos cardiotônicos, usando o reagente de Keller-Killiani. Só não foram encontrados derivados antracênicos livres, taninos e cumarinas voláteis. Com a identificação dos componentes presentes no extrato etanólico das inflorescências utilizando reagentes específicos, conclui-se que o mesmo apresenta

metabólitos secundários, que são compostos de grande interesse na medicina tradicional.

Rigo (2008), utilizando a técnica de cromatografia de coluna fina, detectou a presença de 17 manchas diferentes e, utilizando padrões obtidos de outras espécies do gênero *Solanum*, identificou a presença dos compostos químicos no extrato dos frutos: solasodina, solasodieno, clorogenina, tomatidenol, tigogenina e diosgenina.

Atualmente, inúmeros experimentos evidenciam o fato de que muitos metabólitos secundários presentes nas plantas, como os terpenos, alcaloides, glicosídeos cianogênicos, saponinas, taninos, antraquinonas são aleloquímicos que representam caracteres adaptativos e que tem se diversificado durante a evolução pela seleção natural a fim de proteger as plantas contra vírus, bactérias, fungos, plantas concorrentes e contra os herbívoros (WINK, 2003).

Muitas espécies de não *albicans* mais comumente isoladas são menos susceptíveis aos derivados azólicos, dificultando o tratamento dessas infecções. Embora a susceptibilidade das leveduras do gênero *Candida* aos antifúngicos disponíveis seja variável e previsível, nem sempre uma determinada amostra isolada segue o padrão geral essa é uma das razões da crescente importância dos testes de susceptibilidade (CROCCO et al., 2004).

Conforme relatado nos estudos de Rex et al. (2000), as espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* das leveduras do gênero *Candida* são susceptíveis aos antifúngicos anfotericina B, itraconazol e fluconazol pelo padrão geral de susceptibilidade (método M27-A NCCLS).

Resultados semelhantes foi encontrado por Alves et al. (2005) ao testar extratos brutos etnólicos das folhas e frutos verdes e maduros de *S. palinacanthum*, observando uma inibição do crescimento da levedura *C. albicans*. Além disso, Nascimento, Silva e Orlandia (2006) relataram a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos vegetais de *S. paniculatum* Lam., sobre o crescimento da bactéria *Ralstonia solanacearum*.

Bento et al. (2004) fez uma investigação fitoquímica e farmacológica do extrato etanólico obtido dos frutos de *S. acanthodes* coletados no município de Porto Velho - RO para avaliar as atividades antinociceptiva

em camundongos. Os animais receberam injeção intraplantar de glutamato e nocicepção induzida pela formalina, passando a lamber a pata, como indicativo de dor. Estes animais foram tratados com o extrato etanólico dos frutos dessa espécie, onde se observou de forma significativa a redução de lambida ou mordida induzidas pelo glutamato e formalina, sendo, portanto, considerado antinocepsivo e expressivo na dor inflamatória.

Azevedo et al. (2004) avaliaram o potencial antioxidante do extrato etanólico do fruto de *S. acanthodes* e *S. crinitum*. Os resultados mostraram que os dois extratos foram eficazes contra o agente oxidante DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila), utilizando-se o método do radical livre estável. Contudo, o extrato do *S. acanthodes* mostrou-se dependente da dose, pois, com o aumento da dose utilizada, houve um aumento da atividade antioxidante, ao contrário do extrato do *S. crinitum*, que se mostrou estável.

Um importante fator a ser considerado quando se realiza qualquer pesquisa envolvendo plantas medicinais e se tenta extrapolar os resultados obtidos, é quanto a fatores ambientais envolvidos no momento da coleta da planta, como sazonalidade, clima, tipo de solo e temperatura do ar. De acordo com Freitas et al. (2004), a produção de metabólitos secundários pela planta ocorre em função da interação planta versus ambiente em resposta a fatores químicos e biológicos. Este fato pode explicar resultados divergentes de extratos da mesma espécie, mas coletado em locais e períodos diferentes. O extrato vegetal de *S. acanthodes* testado neste estudo foi obtido a partir de vegetais colhidos em única estação do ano (Inverno), em único período do mês (outubro do referido ano) e da mesma localidade do município de Porto Velho - RO.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos do extrato etanólico das folhas de *S. acanthodes*, conclui-se que esta planta apresentou atividade fungicida sobre *C. albicans*, pois apresentou maior índice de inibição se comparado ao produto químico, porém novos métodos e concentrações precisam ser testados para, então, esta

planta ser empregada em programas de manejo integrado de pragas.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Fitoquímica e Microbiologia da Faculdade São Lucas pelo auxílio na produção dos extratos e na cultura dos fungos.

REFERÊNCIAS

- ALVES, A. A.; PIRES, A. F.; LINARDI, V. R.; REINA L. C. B.; GALVÃO, C. Atividade Antibacteriana e Antifúngica dos extratos brutos etanólicos de *Solanum palinacanthum*. In: ENCONTRO DE PESQUISA DE IES DO SISTEMA ESTADUAL DE MINAS GERAIS, 3, 2005, Caratinga. **Anais...Caratinga**: [s.n.], 2005. p. 143.
- AZEVEDO, M. S.; VALE, C. A. S.; SANTOS, O. A.; SOARES, P. Atividade larvicida de frutos de *Solanum stramonifolium* contra *Anopheles darlingi*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS, 18, 2004, Manaus. **Anais... Manaus**: [s.n.], 2004, p. 119.
- BENTO, A. F.; AZEVEDO, M. S.; LUIZ, A. P.; MOURA, J. A.; SANTOS, A. R. S. Atividade antinocepsiva do extrato etanólico do fruto de *Solanum acanthodes* Hook.f. em camundongos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, p. 9-10, 2004.
- CORDEIRO, L. N. Efeito *in vitro* de extratos etanólicos da raiz de jurubeba (*Solanum paniculatum* L.) e das folhas de Melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L.) sobre ovos e larvas de nematoides gastrintestinais de caprinos. 2008. 64f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, Campina Grande, 2008.
- COWEN, L. E.; ANDERSON, J. B.; KOHN, L. M. Evolution of drug resistance in *Candida albicans*. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 139-165, 2002.
- CROCCO, E. I.; MIMICA, L. M. J.; MURAMATU L. H.; GARCIA, C.; SOUZA, V. M.; RUIZ L. R. B.; ZAITZ, C.

- Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica *in vitro*: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 1, p. 689-697, 2004.
- DUARTE M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. Construindo a história dos Produtos Naturais. **Multi Ciência: Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da Unicamp**, v. 7 n. 1, p. 1-16, 2006.
- FREITAS, M. S. M.; SOUZA, P. H.; BELLO, O. I.; JAQUES, R. S. Crescimento e produção de fenóis totais em carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) D.C.] em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares, na presença e na ausência de adubação mineral. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 3, p. 30-34, 2004.
- GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P.; WANDERLEY, M. G. L.; BERG, C. V. D.; Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Revista Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 54-61, 2005.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, C. A.; VEIG, J. V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
- NASCIMENTO, L. C. S.; SILVA, T. A.; ORLANDA, J. F. F. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos vegetais de *Solanum paniculatum* L. sobre o crescimento de *Ralstonia solanacearum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 46, 2006, Salvador. **Anais...** Salvador: ABQ, 2006.
- NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; BARBOSA-JÚNIOR, A. M.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 108-113, 2008.
- NEE, M. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Solanaceae. **Rodriguésia**, v.58, n.3, p.695-702, 2007.
- PIRES, L. S. S.; LIMA, R. A.; HERNÁNDEZ, A. E. F.; SOUZA, A. C. R.; SANTOS, M. R. A. Estudo fitoquímico do extrato etanólico das inflorescências de *Solanum acanthodes* Hook. In: MOSTRA CIENTÍFICA, 4, 2009, Porto Velho. **Anais**. Porto Velho: Ed. Faculdade São Lucas, 2009. 12p.
- REX, J. H.; WALSH, T. J.; SOBEL, J. D.; FILLER, S. G.; PAPPAS, P. G.; DISMUKES, W. E; EDWARDS, J. E. Practice Guidelines for the treatment of candidiasis: infectious diseases society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. 4, p. 662-678, 2000.
- RIGO, V. A. A. **Estudo fitoquímico preliminar do *Solanum acanthodes* Hook. (Família Solanaceae)**. 2008. 49f. Monografia (Graduação) - Faculdade São Lucas, Porto Velho, 2008.
- SANTOS, M. R. A.; LIMA, R. A.; FERNANDES, C. F.; SILVA, A. G.; FACUNDO, V. A. ANTIUNGAL ACTIVITY OF *Piper marginatum* L. (PIPERACEAE) ESSENTIAL OIL ON IN VITRO *Fusarium oxysporum* (SCHLECHT). **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 1, p. 09-14, 2011.
- SOARES, E. L. C.; VIGNOLI-SILVA, M.; VENDRUSCOLO, G. S.; MENTZ, L. A. Solanaceae Nativas no Rio Grande do Sul, Brasil: Listagem I. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 1050-1052, 2007.
- VAZ N. P. **Constituintes Químicos de *Solanum caavaurana* Vell.; Isolamento, Mapeamento Fitoquímico por IES-EM/EM e sua aplicação no tratamento da Hanseníase**. 2010. 25f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, 2010.
- WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, n. 1, p. 3-19, 2003.

Recebido em: 03 de fevereiro de 2013

Aceito em: 10 de março de 2013