

Atividade antifúngica das folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* frente a *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*

Antifungal activity of the leaves of *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* against *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*

Tatiane Vieira Braga¹, Juliana Tensol Pinto², Maria Elisabete da Silva Barros³, Tânia Toledo de Oliveira⁴, Rosana Gonçalves Rodrigues das Dores⁵, Tanus Jorge Nagem⁵

Resumo: A espécie vegetal *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* é conhecida como "Insulina vegetal" e utilizada na medicina popular no tratamento da *diabetes mellitus*. O paciente diabético tem maior risco de infecções urinárias e *Candida* spp. é o principal gênero envolvido. Avaliou-se a atividade antifúngica do extrato hidroalcoólico e de suas frações frente a *Candida albicans* ATCC 18804, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida tropicalis* ATCC 750. Os resultados obtidos indicaram que folhas de *C. verticillata* têm potencial antifúngico promissor nas frações diclorometano e clorofórmio, com concentração inibitória mínima de 125 µg/mL em *C. krusei* e em *C. tropicalis* respectivamente. São necessários novos testes com constituintes químicos isolados dessas frações, buscando atividade superior na inibição do crescimento de *Candida* spp.

Palavras-chave: *Candida* spp; *Cissus verticillata*; Atividade antifúngica

Abstract: The species *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* is known as "Vegetable insulin" and is used in popular medicine for the treatment of diabetes mellitus. The diabetic patient has a greater risk of urinary infections, and *Candida* spp. is the main gender involved. Was evaluated, the antifungal activity of the hydroalcoholic extract and its fractions against *Candida albicans* ATCC 18804, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 and *Candida tropicalis* ATCC 750. The results indicated that leaves of *C. verticillata* has promising potential antifungal in fractions diclorometano and chloroform, with minimum inhibitory concentration of 125 µg/mL in *C. krusei* and *C. tropicalis* respectively. We need new tests with chemical constituents of these fractions isolated, seeking higher activity in inhibiting the growth of *Candida* spp.

Keywords: *Candida* spp; *Cissus verticillata*; Antifungal activity

INTRODUÇÃO

A espécie vegetal *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* é conhecida popularmente como insulina vegetal⁽¹⁾ cortina japonesa, cipó-pucá⁽²⁾ e anil trepador;⁽³⁻⁵⁾ O chá das folhas é utilizado na medicina popular no tratamento da *diabetes mellitus*.⁽²⁾ A *diabetes mellitus* atinge cerca de 177 milhões de pessoas no mundo e estima-se que este número deverá dobrar até 2030. Aproximadamente 4 milhões de mortes ao ano são atribuíveis às complicações da diabetes e os custos em atenção ao paciente diabético variam de 2,5% a 15% dos orçamentos anuais de saúde. O Brasil está entre os dez países com maior número de pacientes diabéticos segundo a Organização Pan-Americana de Saúde, 2003.⁽⁶⁾

O paciente com *diabetes mellitus* tem maior risco de infecções urinárias e *Candida* spp. é o principal gênero envol-

ido. Dentre as espécies desse gênero, *Candida albicans* é a principal responsável pelas infecções fúngicas.⁽⁷⁾ Existem outras espécies inseridas no gênero *Candida* como *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis*, que também podem estar envolvidas na etiologia da candidíase.⁽⁸⁾

As infecções oportunistas em Dermatologia, nos países desenvolvidos (tropicais e subtropicais) têm como patógenos mais frequentes fungos dermatófitos e a levedura *Candida* spp.⁽⁹⁾

Com frequência, as infecções fúngicas são de difícil tratamento e, considerando a resistência das leveduras pertencentes ao gênero *Candida* frente aos antifúngicos atualmente utilizados,⁽⁸⁾ torna-se importante a busca de novos compostos antifúngicos de origem vegetal que possam auxiliar a terapêutica.

¹Mestre em Ciências Farmacêuticas, CiPharma, Universidade Federal de Ouro Preto

²Graduanda em Farmácia, bolsista de Iniciação Científica, Universidade Federal de Ouro Preto

³Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Ouro Preto.

⁴Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Viçosa

⁵Departamento de Química, Universidade Federal de Ouro Preto

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta, identificação do material vegetal, preparação e fracionamento do extrato

As folhas de *C. verticillata verticillata* utilizadas no estudo foram coletadas no bairro Antônio Dias, Ouro Preto, Minas Gerais, no mês de julho de 2007, no período da manhã. Confeccionou-se exsicata, que foi identificada pelo especialista Dr. Julio Antônio Lombardi, da Unesp, Rio Claro, e depositada no Herbario José Badini da Universidade Federal de Ouro Preto (Oupr 20570).

As folhas coletadas foram selecionadas, passadas em água corrente, dispostas em papel absorvente a fim de retirar o excesso de água e posteriormente colocadas em estufa com ventilação forçada, Fabbe modelo 171, a 45°C, até peso constante.

O extrato vegetal hidroalcoólico das folhas (EHA) foi preparado por meio do método de remaceração.⁽¹⁰⁾ As folhas secas de *C. verticillata verticillata* foram deixadas em repouso direto em solvente água/etanol 1:1 por 72 horas. Após esse período filtrou-se o extrato em gaze. O procedimento foi realizado repetidas vezes até a extração do material vegetal.

O EHA foi seco em evaporador rotatório (Buchi, R114, Suíça) à pressão reduzida, até consistência resinosa. Posteriormente foi seco em liofilizador (Metal-Lux, Divisão de vácuo, Brasil), até a obtenção do liofilizado.

O EHA foi fracionado através de partição líquido-líquido (Figura 1). Dessa forma, dissolveu-se o EHA em água destilada, uma parte do extrato foi insolúvel em água, formando o precipitado 1 (P1). Com fase aquosa iniciou-se a partição utilizando-se os solventes hexano, diclorometano, clorofórmio e acetato de etila, formando respectivamente as frações FH, FD, FC e FA (Figura 1).

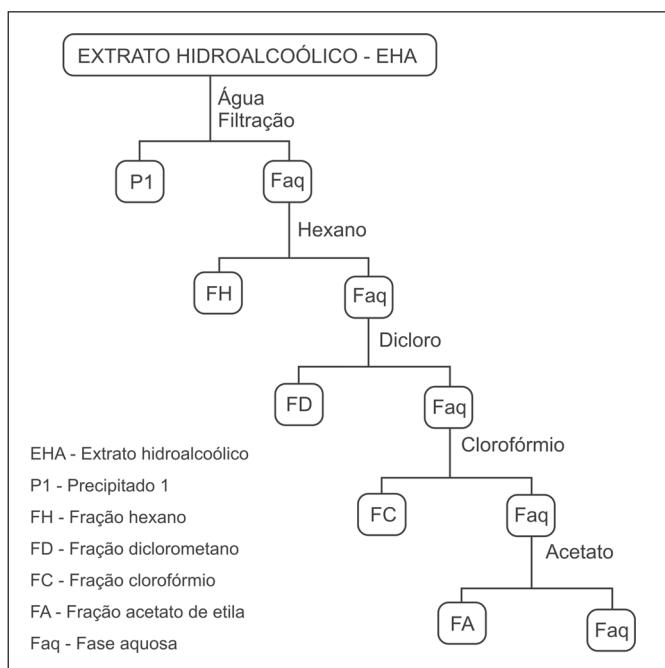


Figura 1 - Esquema do fracionamento do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. verticillata verticillata*

Preparo das amostras

O EHA, P1, e as frações FH, FD, FC e FA constituíram as amostras de análise. Mentol (M) e os antifúngicos cetoconazol (Janssen-Cilag) e fluconazol (Pfizer) os controles de referência.^(11,12)

Todas as amostras foram solubilizadas em DMSO (Merck), na concentração de 1% do volume da solução mãe, à exceção do fluconazol que foi diluído em água destilada esterilizada. A partir dessas soluções foi procedida a preparação de diluições seriadas das amostras em meio de cultura RPMI-1640 (Sigma) conforme a metodologia empregada (Clinical Laboratory Standards Institute CLSI - documento M27-A3).⁽¹³⁾

As concentrações testadas corresponderam às faixas intervalares entre 1 a 512 µg/mL para amostras e mentol; 0,015 a 8 µg/mL para cetoconazol e 0,125 a 64 µg/mL para fluconazol.

Microrganismos utilizados e preparação dos inóculos

Foram utilizadas as espécies *Candida albicans* ATCC 18804, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida tropicalis* ATCC 750 pertencentes ao Laboratório de Micologia da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto.

No crescimento e manutenção das culturas de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foi utilizado o meio Sabouraud dextrose (Himedia, Mumbai - Índia).

As amostras de *Candida* spp. foram cultivadas em tubos contendo meio Sabouraud sólido e incubadas a 28°C durante 24 horas. A massa de células obtida foi recolhida assepticamente com alça esterilizada e ressuspensa em tubos contendo 5 mL de solução salina 0,85% estéril. O inóculo foi preparado com cerca de 10⁶ unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL), equivalente a escala de turvação 0,5 da escala MacFarland.

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada segundo protocolo M27-A3 do CLSI, em microplacas com 96 poços. Em cada orifício foram dispensados 100 µL da amostra teste e 100 µL do inóculo de cada espécie de *Candida* spp., perfazendo volume final de 200 µL em cada poço. Todas as concentrações foram testadas em duplicata. As placas foram incubadas a 28°C e as leituras foram realizadas após 48 horas.

As CIMs foram obtidas por leitura visual e expressas em redução de crescimento, comparadas ao controle positivo, sendo de 80% em fluconazol e cetoconazol e 100% no mentol^(11,12) e nas amostras.⁽¹⁴⁾

RESULTADOS

O extrato hidroalcoólico (EHA) das folhas de *C. verticillata verticillata*, o precipitado 1 (P1), a fração diclorometano (FD), clorofórmio (FC), acetato de etila (FA) e o mentol (M) inibiram o crescimento fúngico conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima do extrato hidroalcoólico e frações de *C. verticillata verticillata* pelo método de microdiluição em placa.

Microorganismos	ATCC	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)							
		EHA	P1	FD	FC	FA	M	Flu	Ceto
<i>C. albicans</i>	18804	256	256	256	256	256	256	2	0,25
<i>C. krusei</i>	6258	256	512	125	256	256	125	4	0,25
<i>C. parapsilosis</i>	22019	256	512	256	256	256	256	4	0,25
<i>C. tropicalis</i>	750	256	512	256	125	256	256	> 64	4

EHA = Extrato hidroalcoólico; P1 = Precipitado 1; FD = Fração diclorometano; FC = Fração clorofórmio; FA = Fração acetato; M = Menthol; Flu = Fluconazol; Ceto = Cetoconazol

DISCUSSÃO

Dentre as amostras testadas pelo método de microdiluição em placa, as frações FD e FC tiveram os resultados mais significativos com CIM de 125 µg/mL em *C. krusei* e em *C. tropicalis* respectivamente. O perfil de inibição do crescimento da FD foi igual ao perfil de inibição do mentol, sendo a CIM de 256 µg/mL em *C. albicans*, 125 µg/mL em *C. krusei*, 256 µg/mL em *C. parapsilosis* e 256 µg/mL em *C. tropicalis*.

Segundo Pereira et al.,⁽¹⁵⁾ o mentol promoveu inibição do desenvolvimento micelial dos fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus* nas concentrações 1500 e 2000 mg/mL, respectivamente. A atividade antimicrobiana do mentol parece estar associada ao caráter lipofílico.⁽⁹⁾

No estudo de Silva et al.,⁽¹⁶⁾ atividade antifúngica de *C. verticillata* foi relatada nas frações clorofórmio e acetato de etila que continham respectivamente o sesquiterpenoide bicilogermacreno e resveratrol (3, 4', 5 trihidroxiestilbeno). Outros compostos como os flavonoides kaempherol, querçetina e luteolina foram identificados em folhas de *C. sicyoides*.⁽²⁾

No entanto, na fração acetato de etila (FA), a CIM em *Candida* spp não superou as expectativas, embora sejam detectados nessa fração os compostos fenólicos, flavonoides e taninos.

A fração acetato de etila das folhas da espécie *Pyrostegia venusta* inibiu o crescimento de *Candida albicans* na concentração de 300 µg/mL. Detectaram-se em tal espécie flavonoides e compostos fenólicos.⁽¹⁷⁾ O extrato das folhas de *Baccharis dracunculifolia* também inibiu o crescimento de *Candida krusei* na concentração de 65 µg/mL.⁽¹⁸⁾ O extrato aquoso de *Serjania erecta* teve atividade antifúngica contra *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* com CIM de 62,5 µg/mL. A atividade antifúngica deve-se provavelmente à presença de flavonoides no extrato.⁽¹⁹⁾

Não existe consenso sobre o nível de inibição aceitável nos produtos naturais quando comparados com antifúngicos padrões; dessa forma, Aligianis et al.⁽²⁰⁾ propuseram a classificação dos materiais vegetais com base nos resultados de CIM, considerando como forte inibição a CIM até 500 µg/mL; inibição moderada a CIM entre 600 e 1500 µg/mL e como fraca inibição a CIM acima de 1600 µg/mL.

No trabalho de Magina et al.⁽²¹⁾ foram considerados ativos os extratos de *Eugenias* sp. com CIM menor que 1000 µg/mL, e muito ativos os extratos com CIM inferior a 100 µg/mL. Dessa

forma, nas amostras testadas, as CIMs foram todas inferiores a 512 µg/mL, podendo portanto, serem consideradas ativas.

CONCLUSÃO

Os dados obtidos nesse estudo indicaram que folhas de *C. verticillata verticillata* têm potencial antifúngico promissor nas frações diclorometano e clorofórmio. São necessários novos testes com constituintes químicos isolados dessas frações, buscando atividade superior na inibição do crescimento de *Candida* spp.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Federal de Ouro Preto, CNPq e Fapemig pelo subsídio concedido.

REFERÊNCIAS

- Oliveira AB. *Cissus verticillata* (VITACEAE): Informações etnofarmacológicas e anatomia dos órgãos vegetativos. Viçosa, MG: UFV, 2006, 75p. (tese).
- Barbosa WL, Santos WR, Pinto L N, Tavares IC. Flavonóides de *Cissus verticillata* e a atividade hipoglicemiante do chá de suas folhas. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2002;12: supl., p.13-15.
- Beltrame FL, Sartoretto JL, Bazotte RB, Cuman RN, Cortez DA. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antidiabético de *Cissus sicyoides* L. (VITACEAE). Química Nova. 2001;6:783-5.
- Corrêa MP. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926.
- Souza, V. C.; Lorenzi, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005. 640p.
- Organização Pan-Americana de Saúde. Doenças crônico-degenerativas e obesidade: estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde. Brasília, 2003. Disponível em http://www.opas.org.br/sistema/arquivos/d_cronic.pdf. Acesso: dezembro 2006.
- Schedhter M, Guimarães-Walker AP. Diabetes mellitus e doenças infecciosas. In: Oliveira JE, Milech A. Diabetes mellitus - clínica, diagnóstico, tratamento multidisciplinar. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. Cap.17, p.199-215.
- Lima IO, Oliveira RA, Lima EO, Farias NM, Souza EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2006;16(2):197-201.
- Duarte MC. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. MultiCiência, v. 7, 2006.
- Sonaglio D, Ortega GG, Petrovick PR, Bassani VL. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: Simões C. M, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JC, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5a. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004. Cap.13, p. 289-326.
- Matos BM, Komiya EY, Balducci I, Koga-Itaya CY. Atividade antifúngica do extrato alcoólico de *Mentha piperita* sobre *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Revista de Odontologia da UNESP. 2009;38(4):244-8.
- Sabzghabaei AM, Nili F, Ghannadi A, Eizadi-Mood N, Anvari M. Role of menthol in treatment of candidal napkin dermatitis. World J Pediatr. 2011; 7(2):167-70.
- CLSI. Clinical Laboratory Standards Institute, Reference method for both dilution antifungal susceptibility testing of yeast: approved standard M27-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standard, Wayne, PA, 2008.
- Gupta AK, Kohli Y. In vitro susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and intraconazole against dermatophytes and non-dermatophytes, and evaluation of combination antifungal activity. Br J Dermatol. 2003;149(2):296-305.
- Pereira MC, Vilela GR, Costa LM, Silva RF, Fernandes AF, Fonseca EW, Piccoli RH. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. Ciência Agropecuária. 2006;30(4): 731-8.
- Silva L, Oniki GH, Agripino DG, Moreno PR, Young MC, Mayworm, MA, Ladeira AM. Bicilogermacreno, resveratrol e atividade antifúngica em extratos de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis (Vitaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia. 2007;17(3): 361-7.

17. Silva PB, Gregol AFO, Medeiros AC, Duarte MC, Santos C. Antimicrobial activity of extracts from *Pyrostegia venusta*. In: 1ST Brazilian Conference on Narural Products and XXVII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology [RESEM]; São Pedro, SP, 2007.
18. Silva Filho A A, Resende DO, Fukui MJ, Furtado NA, Silva ML, Cunha WR, Sousa JP, Gregorio LE. Phytochemical study and comparative evaluation of the in vitro antimicrobial activity of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and brazilian green propolis. In: 1ST Brazilian Conference on Natural Products and XXVII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology [RESEM]; São Pedro, SP, 2007.
19. Oliveira PV, Fachin AP, Rossetti ES, França SC, Pietro RC, Fusco-Almeida AM, Pereira PS. Antifungal activity of *Serjania erecta* Radlk. In: 1ST Brazilian Conference on Narural Products and XXVII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology [RESEM]; São Pedro, SP, 2007.
20. Aligianis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. J Agric Food Chem. 2001;49(9):4168-70.
21. Magina MD, Johann S, Resende MA, Pizzolatti MG, Brighente IM. Antifungal activity of three *Eugenia* species. In: 1ST Brazilian Conference on Narural Products and XXVII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology [RESEM]; São Pedro, SP, 2007.

Autor correspondente
Tatiane Vieira Braga

Centro de Saúde, Campos Universitário Morro do Cruzeiro,
Universidade Federal de Ouro Preto, s/n
35400-000 – Ouro Preto, MG, Brasil
e-mail: tativbr@yahoo.com.br