

## **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO AQUOSO E HIDROALCOÓLICO DO MASTRUZ SOBRE ESPÉCIES DE *ASPERGILUS SP* E *CANDIDA SP***

Daniella Paternostro de Araújo GRISÓLIA

GRISÓLIA, Daniella Paternostro de Araújo. **Avaliação da atividade antifúngica do extrato aquoso e hidroalcoólico do *Mastruz* sobre espécies de *Aspergillus sp* e *Candida sp***. Projeto de investigação científica do Curso de Farmácia – Centro Universitário Fibra, Belém, 2017.

O uso de plantas no tratamento de enfermidades vem sendo realizado há milhares de anos, buscando recursos para melhorar a qualidade de vida, no entanto de forma empírica (BRAGA, 2001). Em vista disso, despertou o interesse de pesquisadores. Os primeiros relatos de uso dos recursos da flora com finalidade terapêutica deriva do papiro de Ebers, escrito por volta de 1500 a.C., com informações de 811 prescrições e 700 remédios. Desde então, os povos primitivos passaram a fazer observações e experimentações sobre propriedades terapêuticas de diversas plantas, conhecimento que vem sendo

carregando informações valiosas (SÁ, 2013). No Brasil, o uso das plantas medicinais foi disseminado principalmente pela cultura do índio, africano e europeu (OLIVEIRA *et al.*, 2014). No século XIX, o Brasil era um país essencialmente rural, com uso exclusivo de plantas medicinais e extratos vegetais. Em meados do século XX, o conhecimento tradicional passou a ficar em segundo plano, pois iniciou o processo de isolar os princípios ativos (LORENZI, 2008). Durante muitos e muitos anos, o mercado farmacêutico foi dominado pelos fármacos de origem sintética. Após algumas décadas de dormência, as plantas medicinais voltaram a adquirir importância no tratamento de saúde, ressurgindo o interesse pela pesquisa (SÁ; 2013), que busca avaliar a eficiência terapêutica e os riscos da utilização do uso tradicional de plantas pela sociedade (OLIVEIRA *et al.*, 2014). As plantas medicinais são importantes fontes de substâncias capazes de inibir o crescimento de bactérias e de fungos, por meio dos seus metabolitos secundários, óleos, extratos ou substâncias isoladas, contribuindo fortemente para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas devido a combinações químicas. O Brasil é um país que possui um grande potencial para o crescimento no

mercado de fitoterápicos, visto que possui uma das maiores biodiversidades do planeta. Dentre as plantas medicinais do bioma brasileiro, destaca-se o mastruz (FERREIRA, 2013), uma espécie da família Amaranthaceae, originária do México, porém pode ser encontrada em todos os países de clima temperado e tropical, de forma silvestre ou cultivada, sendo considerada uma planta daninha (MOURA, 2016). No território brasileiro, encontra-se vastamente distribuída, conhecida popularmente como mastruz, erva de santa Maria, ambrisina, ambrósia do México, mastruço, mestruço, mata cobra, erva do formigueiro e lombrigueira (LORENZI *et al.*, 2008). É uma planta herbácea de pequeno porte, com até 1m de altura. Possui propriedade aromática fortemente notável. Pode ser perene ou anual. É muito ramificada e suas folhas são simples, alternadas, pecioladas de tamanhos diferentes, sendo menores e mais finas na parte superior da planta. As flores são pequenas, verdes e os frutos, esféricos, pretos, ricos em óleo (LORENZI *et al.*,2008). Possui propriedades analgésicas, digestivas, antimicrobianas, atividades antioxidantes, sedativas, tônicas, anti-inflamatórias, antissépticas, antifúngicas e cicatrizantes (OLIVEIRA *et*

al., 2014). No uso popular, é usada como vermífugo, antibiótico, antirreumática, antigripal e expectorante (BERG, 1982). Em relação a sua atividade fitoquímica, possui variedade de compostos orgânicos como terpenos, taninos, esteroides, saponinas, triterpênicas, flavonoides e alcaloides responsáveis pela sua ação farmacológica (BAUMGART; 2014). A composição química de um extrato pode ser conhecida por meio de testes químicos qualitativos rápidos e de baixo custo, sugerindo as possíveis classes de metabólitos secundários de interesse (MATOS, 1997). Diante do exposto e devido à escassez de trabalhos abordando a questão da sensibilidade *in vitro* dos fungos frente à atividade antifúngica do extrato aquoso de *Chenopodium ambrosioides* (Mastruz), é de interesse o estudo dessa espécie e seus compostos bioativos, visando a sua utilização como fonte de recursos terapêuticos. Sabendo-se do aumento de infecções fúngicas, há a necessidade pela busca de antifúngicos que permita que os tratamentos terapêuticos de diferentes tipos de infecções micóticas tenham maior evolução. Nesse contexto, produtos de origem vegetal atuam como uma importante e promissora fonte para a descoberta de novos agentes

antifúngicos. Sabe-se que a Região Amazônica tem um vasto acervo de plantas medicinais que ainda não foram profundamente estudadas. Este trabalho visa a avaliar a sensibilidade *in vitro* dos fungos frente à atividade antifúngica do extrato aquoso *Chenopodium ambrosioides* (Mastruz). A planta foi coletada em Mosqueiro e identificada na EMBRAPA, no segundo semestre de 2017, no município de Belém, estado do Pará -- Brasil. A matéria-prima foi processada em laboratórios da Faculdade Integrada Brasil Amazônia (FIBRA). As folhas foram submetidas à secagem, seguindo a preparação do extrato. A escolha, quanto às partes da planta, seguiu orientações do uso popular. Foram utilizados os princípios de assepsia visando à preservação da qualidade do material. O material, após sua coleta, foi colocado para secar à temperatura ambiente por 48h, em lugar seco e arejado. Em seguida, todo o material foi submetido à secagem em estufa à temperatura de 38 – 40 °C, até estabilização da umidade residual. Após a secagem, foi moído até se obter um fino pó para facilitar a extração. Posteriormente, as amostras foram pesadas e o extrato aquoso foi obtido pela técnica de maceração, a partir de 10 gramas das folhas moídas com 100 ml de solução

aquosa, por um período de sete dias dentro da geladeira. Em seguida foi feito o preparo do extrato hidroalcoólico. A amostra foi pesada e obtida pela técnica de maceração, a partir de 20 gramas da folha, moída com 200 ml de álcool 70%, por um período de sete dias a temperatura ambiente. O extrato do mastruz foi submetido à análise fitoquímica para determinação das principais classes químicas de metabólitos secundários de acordo com o protocolo escrito por Matos (1997). Foram realizados testes para identificação de saponina, açúcares redutores, taninos, flavonoides e alcaloides. Para isso, foram utilizados 5 ml em 02 tubos de ensaio; em seguida, adicionados 20 ml da solução de HCl 5%. A solução foi aquecida até a fervura, por 10 minutos, e, após filtração, foi dividida em 04 tubos de ensaio. Posteriormente, foram adicionadas gotas dos reagentes: Dragendorff, Bouchardat, Mayer e Bertrand. As formações de precipitados nos tubos indicam resultado positivo. Foram adicionados 20 ml do extrato, em um béquer de 60 ml, e este foi levado à ebulição por cinco minutos. A solução resultante foi filtrada e submetida à reação de Shinoda, na qual adicionaram-se 2 ml do extrato em um tubo de ensaio, raspas de magnésio metálico e gotas de HCl

concentrado. Observou-se, após o desprendimento de hidrogênio, a mudança da coloração para rósea ou vermelha. Foram utilizados 2 ml do extrato, os quais foram submetidos à ebulição, com 50 ml de água por 5 minutos e, após arrefecimento, a solução foi filtrada e dividida em 4 tubos. Para o primeiro tubo, foi transferida uma alíquota de 1 ml e adicionada 1 gota de HCl 5%. Posteriormente, gotejou-se lentamente a solução de gelatina a 2,5 %. O aparecimento de precipitados foi considerado indicativo de resultado positivo. No segundo tubo, foi adicionado 1 ml da solução extrativa, 10 ml de água destilada e 1 gota de FeCl 2%. No terceiro tubo, foram utilizados 5 ml da solução extrativa, ao qual foram adicionados 10 ml de solução aquosa, de ácido acético 10 % a 5 ml de acetato de chumbo 10%. O resultado positivo pode ser observado por meio da formação de precipitado. Em 5 ml do extrato, adicionaram-se 2 ml de clorofórmico e 5 ml de água destilada. Em seguida, a solução foi agitada energicamente, no sentido vertical, por 3 minutos, e observada a formação de espuma, por isso deixada em repouso por 30 minutos. Para os ensaios com fungos, foram utilizadas as seguintes cepas de fungos leveduriformes: *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida*

*tropicalis* (ATCC 750), *Candida Krusei* (ATCC 6258), *Candida parapsilosis*. Esses fungos foram cultivados em meio ágar Sabouraud-Dextrose ou em Agar Batata. Todas as cepas foram cultivadas em ágar batata-dextrose (Sigma-aldrich, MO, USA) por 48 horas a 30 °C. A suspensão de inóculo foi preparada por raspagem suave da superfície da colônia, usando um swab estéril umedecido com solução salina, contendo 0.05% Tween 40, homogeneizada em vortex por cerca de 5 min. As partículas pesadas na suspensão de células foram deixadas em repouso por 3 a 5 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um tubo estéril e a densidade celular ajustada entre 0.8 a 1 por espectrofotômetro (530 nm). Essa suspensão foi diluída 1:50 em meio de cultivo sintético RPMI (Sigma-aldrich, MO, USA) tamponado com MOPS (Sigma-aldrich, MO, USA). Para a determinação da sensibilidade *in vitro* do extrato hidroalcoólico frente às cepas de *Aspergillus* spp, utilizou-se a técnica método de disco-difusão. Todas as cepas foram cultivadas em ágar batata-dextrose (Sigma-aldrich, MO, USA) por 48 horas a 30 °C. A suspensão do inóculo foi padronizada pela escala de McFarland a fim de fornecer um padrão de fungo filamentoso de  $1 \times 10^6$  a

$5,0 \times 10^6$  UFC/ml. Em seguida, 1 ml do inóculo, foi adicionado, no meio Agar, saboraud dextrose líquido à temperatura de  $37^\circ\text{C}$ . Após esse processo, 10 ml desse meio foram transferidos para placa de petri até a gelificação do meio. Preparação e diluições do extrato hidroalcoólico das folhas do mastruz foram feitas em concentração inicial de 100 mg/ml. Posteriormente, foi realizada uma diluição em série, para verificar a ação do extrato em diferentes concentrações (1:1 até 1:16). A diluição foi feita com solução fisiológica 0,9%. As concentrações dos extratos hidroalcoólico variaram de 100 mg/ml a 6,25 mg/ml. Alíquotas de 30  $\mu\text{l}$  de diferentes concentrações analisadas foram adicionadas sobre os discos de difusão, que receberam numerações identificadas de D1, D2, D3, D4, D5, correspondendo a duas placas por ensaio de cada microrganismo. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a  $37^\circ\text{C}$  por 48 horas, a fim de permitir o crescimento fúngico e verificar a ação do extrato testado por meio da formação de halos de inibição. O mesmo procedimento foi utilizado para o controle positivo, o fluconazol. Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração da substância capaz de inibir completamente o crescimento

fúngico, ou seja, presença de halo maior ou igual de 12 mm. O extrato aquoso da folha do mastruz foi preparado em concentrações iniciais de 100 mg/mL (100.000 µg/ml). Esse extrato foi filtrado em membrana PES 22 µm e, posteriormente, foi realizada uma diluição em série, para verificar ação do extrato em diferentes concentrações (1:1 até 1:512). A diluição foi feita com solução fisiológica. As concentrações dos extratos aquoso do fruto do jucá variaram de 100.000 a 195,31 µg/ml. Alíquotas de 100 µl de cada inóculo de leveduras foram colocadas nos poços das placas contendo o extrato nas diferentes concentrações, de forma que a concentração final analisada para o extrato foi de 50.000 a 97,65 µg/ml. Em cada placa foram colocadas as diferentes espécies de candida. A coluna 1, funcionou como controle de esterilidade (CE) e a coluna 12 funcionou como controle do crescimento (CC). A determinação da CIM foi realizada após dois dias de incubação a 30 °C, sendo definida como a mínima concentração do extrato capaz de inibir em 100% o crescimento visual do fungo, quando comparado com o controle do crescimento. Após a leitura da CIM para leveduras, ocorreu a determinação da concentração fungicida mínima (CFM). Uma alíquota de

20 µl foi retirada dos poços em que não houve crescimento fúngico, sendo posteriormente transferida para placas com ágar Sabouraud-Dextrose (Sigma-aldrich, MO, USA). Foi incluído no teste um controle positivo – CC, e um controle negativo - CE. As placas foram incubadas por três dias a 30 °C e o crescimento foi visualmente observado. Foi determinado como CFM a concentração mínima que impede o crescimento fúngico. Esses ensaios foram realizados em duplicata. Os dados obtidos neste trabalho foram analisados pelo programa GraphPad 5® (GraphPad Software, CA, USA). A média geométrica (MG) representa uma medida de tendência central de uma série valores em progressão geométrica. Os valores para determinação da CIM50 bem como a faixa de valores obtidos são parâmetros para relatar os resultados de teste de suscetibilidade quando várias cepas de uma determinada espécie são testadas. Após a coleta do material, foi realizada a caracterização do exemplar no laboratório de Botânica, pertencente à EMBRAPA. Com a realização da determinação fitoquímica, foi possível verificar a presença de compostos químicos provenientes do metabolismo secundário das plantas (taninos, açúcares redutores,

flavonoides, alcaloides e saponina). A *C. albicans* e *C. tropicalis* apresentaram menor CIM (3.125 µg/ml) em relação à *C. parapsilosis*, que apresentou um CIM (6.250 µg/ml) e *C. Krusei* (12.500 µg/ml), demonstrando maior atividade antifúngica entre as cepas avaliadas. O controle positivo utilizado no experimento foi o Fluconazol e as CIMs para as candidas utilizadas foram: *C. albicans* (CIM= 1 µg/ml), *C. Krusei* (CIM= 64 µg/ml), *C. dubliniensis* (CIM= 2 µg/ml) e *C. tropicalis* (CIM= 4 µg/ml). Após a determinação dos valores CIM do extrato hidroalcoólico do mastruz, seguimos no experimento avaliando outro parâmetro de eficácia do extrato, por meio da determinação da CFM, apresentando os valores máximos e mínimos de CFM e média geométrica da CFM para o extrato hidroalcoólico do mastruz. A *C. tropicalis* apresentou menor CFM (6.2500 µg/ml) em relação à *C. parapsilosis* (12.500 µg/ml), *C. albicans* e *C. krusei* (25.000 µg/ml), demonstrando melhor resposta fungicida entre as cepas avaliadas. No resultado do método disco-difusão em ágar, observou-se que não houve atividade antifúngica, do extrato hidroalcoólico do mastruz frente aos fungos *A. fumigatus*, *A. niger* e *Aspergillus* sp. O resultado da análise botânica e fitoquímica da planta

*Dysphania ambrosioides* permitiram estabelecer parâmetros úteis para a confirmação da autenticidade dessa espécie vegetal. Entre as classes de metabólitos avaliados, o mastruz apresentou positividade para as classes, saponinas, taninos e flavonoides. Com relação aos testes de suscetibilidade in vitro, foi possível concluir que o extrato hidroalcoólico do mastruz apresentou menor CIM para *C. albicans* e *C. tropicalis* e menor CFM para *C. tropicalis*. Os fungos do gênero *Aspergillus* não foram inibidos pelo extrato hidroalcoólico do mastruz nas diferentes concentrações avaliadas. Vale ressaltar que mais estudos devem ser realizados com essa espécie para diferentes fungos com intuito de avaliar sua atividade antifúngica.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Mastruz*. Extrato aquoso e hidroalcoólico. Atividade antifúngica.

## REFERÊNCIAS

BRAGA, Carla de Moraes. **Histórico da utilização de plantas medicinais**. 2011.10F. Monografia (Apresentada como exigência parcial para a obtenção do grau pelo consórcio setentrional de educação a distância). Universidade Estadual de Goiás. Brasília, 2011.

BAUMGART, Ana Milda Karsten. **Avaliação do potencial antimicrobiano das espécies vegetais cipura paludosa e chenopodium ambrosioides.**2014.13F. Monografia (Dissertação de mestrado submetido ao programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas). Universidade do vale do Itajaí. Itajaí, 2014.

BERG, Maria Elisabeth Van Den. **Plantas medicinais na Amazônia: Contribuição ao seu conhecimento sistemático.** Belém, 1982.

FERREIRA, Polyanna da Silva. **Utilização de chenopodium ambrosioides Lineu em animais de produção.**2013.1F. Pós-graduação (Ciência animal da escola de veterinária e zootecnia). Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2013.LIMA, J.L.S et.al.**Plantas medicinais de uso comum no nordeste do Brasil.** Campina Grande,2006, 81p.

LORENZI, Harri; MATOS, Francisco José de Abreu. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas.** 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum,2008.

MAURA, Mariana Del Grassi. **Fitoterápicos de uso oral comercializados no Brasil para o tratamento da osteoartrite: Revisão sistemática e metanálise.** 2016.20F.Dissertação (Pós-graduação em ciências farmacêuticas). Universidade de Sorocaba. São Paulo, 2016.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental.** 2.ed. Fortaleza: Edições UFC,1997. 141 p.

OLIVEIRA, L.S.S; FERREIRA, F.S; BARROSO, A.M.  
**Erva** de santa Maria (*Chenopodium ambrosioides* L):  
**Aplicações clínicas e forma tóxicas**, Rio de Janeiro, 13  
de julho. 2014. *Jornal Brasileiro de ciências animal*, p.466.

SÁ, Rafaela Damasceno. **Estudos farmacognóstico de  
Chenopodium Ambrosioides** (Chenopodiaceae).  
2013.16F. Monografia (Pós-Graduação em ciências  
farmacêuticas)- Universidade Federal de Pernambuco.  
Recife, 2013.