

VII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA – XXV

Semana de Iniciação Científica da URCA e VIII Semana de Extensão da URCA

12 a 16 de dezembro de 2022

Tema: “DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA, INDEPENDÊNCIA E SOBERANIA NACIONAL”



ATIVIDADE POTENCIALIZADORA DO FLUCONAZOL DOS EXTRATOS DE RAÍZES DE *Gossypium hirsutum* FRENTE A *Candida* spp.

Mariana dos Santos Santana¹, Luciene Ferreira de Lima², Victor Juno Alencar Fonseca³, Maria Elenilda Paulino da Silva⁴, Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga⁵

RESUMO

O gênero *Gossypium*, tem importância econômica e na medicina popular é usado para tratar enfermidades como doenças respiratórias, renais, dérmicas, febre, dores, dentre outros. O objetivo do estudo foi identificar a inibição de crescimento através da curva de viabilidade celular e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do extrato aquoso das raízes de *Gossypium hirsutum* (EARG), e da combinação entre extrato e fluconazol (FCZ) contra leveduras oportunistas *Candida albicans* (CA) e *Candida tropicalis* (CT). Os testes foram realizados pelo método de microdiluição em caldo (8 µg/mL a 8192 µg/mL) em placas de 96 poços com controles de diluição, de crescimento fúngico e de esterilidade do meio. Para verificar a ação combinada do produto natural com o fluconazol, o extrato foi testado em concentração sub-inibitória baseada na Concentração Matriz – CM (CM/16) e o fluconazol em diluição seriada (8 µg/mL a 8192 µg/mL). A CFM foi realizada por sub-cultivo da microdiluição em placas de *Petri*. A atividade do extrato mostrou redução de crescimento de microrganismos na concentração de 8192 µg/mL para cepas isoladas *C. tropicalis* URM 4262 e *C. albicans* URM 4387. As cepas padrões foram inibidas em concentrações mais elevadas. A combinação extrato/FCZ demonstrou efeito potencializador contra a cepa padrão de *C. albicans* e isolada de *C. tropicalis*. A CI_{50} variou de 1939 a 4.083 µg/mL (EARG), de 0,036 a 3.196 µg/mL (FCZ) e de 3,044 a 5.335 µg/mL (extrato/FCZ). Extrato e FCZ demonstraram efeito fungistático (CFM \geq 16.384 µg/mL) frente a todas as cepas. A combinação EARG/FCZ mostrou um efeito fungicida (4096 µg/mL), exceto contra *C. albicans* URM 4387 para a qual a CFM foi ainda menor (1024 µg/mL).

Palavras-chave: Malvaceae. Anti-*Candida*. Algodão. Extrato. Potencialização de efeito.

1 Universidade Regional do Cariri, e-mail: mariana.santana@urca.br

2 Universidade Regional do Cariri, e-mail: luciene.ferreira@urca.br

3 Universidade Regional do Cariri, e-mail: victorjuno5@gmail.com

4 Universidade Regional do Cariri, e-mail: elenilda.paulino@urca.br

5 Universidade Regional do Cariri, e-mail: flaviana.morais@urca.br

VII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA – XXV

Semana de Iniciação Científica da URCA e VIII Semana de Extensão da URCA

12 a 16 de dezembro de 2022

Tema: “DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA, INDEPENDÊNCIA E SOBERANIA NACIONAL”



1. INTRODUÇÃO

O algodão, planta medicinal popular pertencente ao gênero *Gossypium* da família Malvaceae, está entre as culturas economicamente mais importantes na indústria têxtil em todo o mundo (THOMPSON, 2017; BABU, 2015). Normalmente, é utilizado por comunidades para tratar enfermidades, tais como problemas respiratórios, de saúde reprodutiva e infecções geniturinárias. Estudos etnobotânicos demonstraram que a espécie *Gossypium hirsutum* L. é tradicionalmente utilizada na preparação de antissépticos para lavagem vaginal na Chapada do Região do Araripe (FERNANDES, 2019). Também é usado para doenças renais e dérmicas, tratamento de malária, hepatite, febre, pneumonia, gripe, tosse com secreções, dor de garganta, distúrbios do nariz, sangramento diarreia e como purgativo (AL-FATIMI, 2010; BIESKI, 2015; LEMOS, 2018).

Esta planta é diferenciada por seus teores fitoquímicos, atividades antioxidantes, atividades antimicrobianas contra bactérias, protozoários e fungos, como *Candida spp.*, que é fungo oportunista e dimórfico com a capacidade de se adaptar e proliferar facilmente, possuindo uma série de fatores de virulência que lhe permitem sobreviver principalmente em tecidos, causando infecções (CHATURVEDI, 2010; TSANG, 2012; ZUZA-ALVES, 2017; GHAFAR, 2018), podendo ser fatal com taxas significativas de morbidade e mortalidade. O desenvolvimento de novas formulações pode ser promissor com compostos bioativos para o tratamento da candidíase usando plantas medicinais como *G. hirsutum* (SPAMPINATO, 2017; RODRÍGUEZ, 2019).

Com base em pesquisas etnobotânicas foi relatada o uso de raízes para o cuidado da saúde (FERNANDES, 2020). Por isso, investigou-se o efeito do extrato aquoso das raízes de *G. hirsutum* L. (AERG) na inibição de crescimento de *Candida albicans* (INCQS 40006; URM 4387) e *Candida tropicalis* (INCQS 40042; URM 4262).

2. OBJETIVO

Verificar a capacidade de inibição do crescimento das leveduras através da Curva de Viabilidade Celular, a Concentração Inibitória de 50% dos microrganismos (CI₅₀) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos extratos e fluconazol e de sua combinação, classificando o tipo de efeito como fungistático ou fungicida.

3. METODOLOGIA

Foram coletados espécimes de algodoeiro localizadas em Brejinho, município de

VII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA – XXV

Semana de Iniciação Científica da URCA e VIII Semana de Extensão da URCA

12 a 16 de dezembro de 2022

Tema: “DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA, INDEPENDÊNCIA E SOBERANIA NACIONAL”



Araripe, Ceará - BR. O extrato aquoso das raízes de *G. hirsutum* (EARG) foi preparado de acordo com Matos (2002), com rendimento de extrato bruto de 2.273 g.

Para determinar a Curva de viabilidade celular e determinação de CI_{50} , 100mL e uma solução contendo 1350 μ L de CSD (Caldo Sabouraud Dextrose) concentrado mais 150 μ L do inóculo com a cepa fúngica (correspondente a 10% da solução total), respectivamente, foram adicionados a cada poço de uma placa de microdiluição. Depois disso, uma diluição em série dos extratos de 100 mL foi realizada (as concentrações variaram de 8192 μ g/mL 8 μ g/ml para os fungos testes). As microdiluições foram realizadas em quadruplicatas e levadas a estufa por 24 horas a 37 °C. As leituras espectrofotométricas foram realizadas no aparelho de ELISA (Termoplate®), utilizando comprimento de onda de 630 nm com resultados sendo usados para obter uma curva de viabilidade celular e CI_{50} . Controles de Diluição, de esterilidade e de crescimento também foram realizados (MORAIS-BRAGA, 2016).

Para verificar a ação combinada do extrato aquoso com o medicamento Fluconazol, foi utilizado o método proposto por Coutinho (2008), no qual o extrato é testado em uma concentração sub-inibitória (MC/16 – leveduras). As placas foram preenchidas no sentido numérico, adicionando 100 μ L de uma solução contendo o extrato, meio de cultura (CSD) e 150 μ L da suspensão fúngica. Os controles de crescimento e diluição foram preparados. Em seguida, foi realizada microdiluição seriada com 100 μ L do fluconazol. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. A leitura foi realizada conforme descrito na sessão anterior. Se observada uma ação positiva para o extrato em combinação com a droga, o efeito é denominado efeito potencializador.

Para determinar a Concentração Mínima Fungicida – CFM, uma haste esterilizada foi introduzida em cada poço da placa de microdiluição da atividade intrínseca e combinada teste, que foi homogeneizado e sub-cultivado em uma placa de Petri contendo ASD (Ágar Sabouraud Dextrose) com uma cartela guia indicando as concentrações testadas, exceto para a esterilidade e o controle. As placas de *Petri* foram incubadas a 37 °C e as leituras foram realizadas após 24 h observando o crescimento ou inibição de colônias de *Candida* spp. (ERNEST, 2000). Nesses testes a CFM não foi determinada, portanto foi testado em concentração sub-inibitória baseada na Concentração Matriz - CM \geq 16.384 μ g/mL (CM/16).

4. RESULTADOS

A atividade intrínseca do extrato aquoso da raiz de *G. hirsutum* (EARG), mostrou uma redução de leveduras na concentração de 8192 μ g/mL para frente as cepas



C. albicans URM 4387 e *C. tropicalis* URM 4262. Este efeito é considerado clinicamente insignificante devido a uma alta concentração do extrato no teste *in vitro*. O fluconazol sozinho teve efeito inibidor semelhante ao do extrato para todas as leveduras, exceto para o isolado de *C. albicans* URM 4387 onde obteve efeito inibidor a partir da concentração 64 µg/mL. A avaliação do efeito potencializador dos extratos sobre Fluconazol contra *Candida* demonstrada em concentrações sub-inibitórias (MC/16: 1024 µg/mL) causou inibição do crescimento leveduriforme na curva de viabilidade em algumas espécies de *Candida* à droga isoladamente (figura 1). O efeito potencializador demonstrou efeito do AERG/FCZ contra a cepa padrão de *C. albicans* e o isolado *C. tropicalis*. Ao analisar o efeito inibitório de 50% sobre a população fúngica AERG mostrou um efeito potencializador contra *C. albicans* INCQS 40006 (IC₅₀ de 516,9 µg/mL) em comparação com a droga padrão (IC₅₀: 2125 µg/mL). A *C. tropicalis* URM 4262 apresentou um efeito potencializador, obtendo uma IC₅₀ de 52,43 µg/mL sobre o FCZ isolado IC₅₀: 3196 µg/mL.

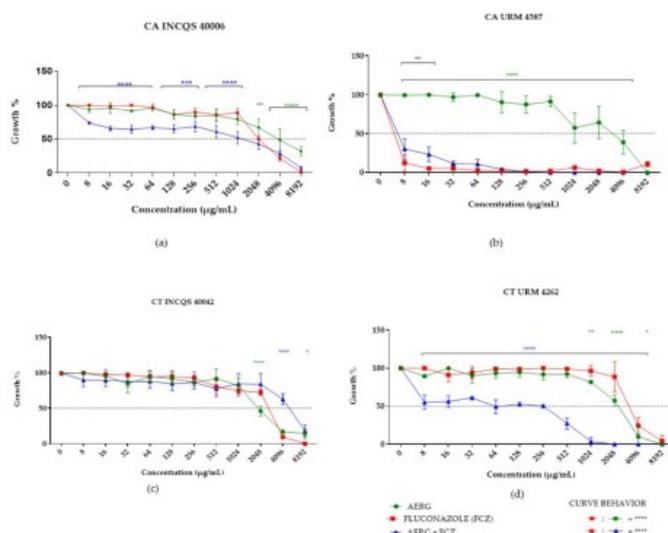


Figura 1. Atividade anti-*Candida* do Fluconazol associado ao AERG na concentração sub-inibitória MC/16 contra: (a) CA INCQS 40006; (b) CA URM 4387; (c) CT INCQS 40042; (d) CT URM 4262.

5. CONCLUSÃO

Quanto à atividade intrínseca e combinada, o extrato demonstrou uma resposta dose-dependente relacionada ao aumento das concentrações. Em combinação com o medicamento fluconazol para avaliar a interferência do perfil de crescimento fúngico, um efeito

VII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA – XXV

Semana de Iniciação Científica da URCA e VIII Semana de Extensão da URCA

12 a 16 de dezembro de 2022

Tema: “DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA, INDEPENDÊNCIA E SOBERANIA NACIONAL”



potencializador significativo contra *C. albicans* e *C. tropicalis* foi mostrado pouco significativo para AERG. Em relação ao extrato aquoso da raiz, apesar de sua ação anti-*Candida*, são necessárias mais pesquisas aprofundadas que representem alternativas no combate à candidíase.

REFERÊNCIAS

- Al-Fatimi, M.; Wurster, M.; Schröder, M.; Lindequist, G.U. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. *J. Ethnopharmacol.* 2007, 111, 657–666.
- Babu, S.; Bidyarani, N.; Chopra, P.; Monga, D.; Kumar, R.; Prasanna, R.; Kranthi, S.; Saxena, A.K. “Evaluating microbe-plant interactions and varietal differences for enhancing biocontrol efficacy in root rot disease challenged cotton crop. *Eur. J. Plant Pathol.*, 2015, 142, 345–362.
- Bieski, I.G.C.; Leonti, M.; Arnason, J.T.; Ferrier, J.; Rapinski, M.; Violante, I.M.P.; Balogun, S.O.; Pereira, J.F.C.A.; Figueiredo, R.D.C.F.; Lopes, C.R.A.S.; Da Silva, D.R. Ethnobotanical study of medicinal plants by population of Valley of Juruena Region, Legal Amazon, Mato Grosso, Brazil. *J. Ethnopharmacol.*, 2015, 173, 383–423
- Chaturvedi, A.; Singh, S.; Nag, T.N. “Antimicrobial activity of flavonoids from in vitro tissue culture and plant parts of medicinally important tree Terminalia arjuna. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 2010, 15, 4959–4963.
- Coutinho, H. D. M.; Costa, J. G. M.; Lima, E. O.; Falcão-Silva, V. S.; Siqueira, J. P. **Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant Escherichia coli by Mentha arvensis L. and chlorpromazine.** *Chemotherapy* 2008, 54, 328–330.
- Coutinho, H.D.M.; Kerntopf, M.R. **Ethnobiological survey of plants and animals used for the treatment of acute respiratory infections in children of a traditional community in the municipality of barbalha, Ceará, Brazil.** *African J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 2016, 13, 166–175.
- Ernst, E. J.; Klepser, M. E.; Ernst, M. E.; Messer, M. A.; Pfaller, S. A. **In vitro pharmacodynamic characteristics of flucytosine determined by time-kill methods.** *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2000, 36, 101–105.
- Fernandes, P.A.S.; Gusmão, A.F.; Silva, R.B.; Fernandes, G.P.; Morais-Mendonça, A.C.A.; Silva, M.A.P.; Morais-Braga, M.F.B. **Diversity of medicinal flora usage in a cerrado area in the Chapada do Araripe, NE, BR.** In *Book Ciências Biológicas Realidades e Virtualidades, 2020th ed.*; da Silva, C. D. D.; Ed. Ponta Grossa: Atena Editora, Paraná - Brasil, 2020, 2020, 1–245.

Fernandes, P.A.S. **Etnobotânica de Plantas Medicinais da Comunidade Baixa do Maracujá (Crato-CE) e Análise Química e Antifúngica de Croton Heliotropiifolius Kunth**. Master's Thesis, Regional University of Cariri—URCA, Crato, Brazil, 2019.

Ghaffar, F.; Khan, I.; Shah, H.; Iqbal, K. **Nutritional, physicochemical, antimicrobial and DPPH free radical scavenging potential of the biotech and conventional hybrids of seeds and seed oils from Gossypium hirsutum L.** *Pure Appl. Biol.* 2018, 7, 765–774.

Lemos, I.C.S.; de Araújo Delmondes, G.; Dos Santos, A.D.F.; Santos, E.S.; de Oliveira, D.R.; de Figueiredo, P.R.L.; de Araújo Alves, D.; Barbosa, R.; de Menezes, I.R.A.

Matos, F. J. de A. **Farmácias Vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. Editora UFC, 2002.

Morais-Braga, M.F.B.; Carneiro, J.N.P.; Machado, A.J.T.; Dos Santos, A.T.L.; Sales, D.L.; Lima, L.F.; Figueredo, F.G.; Coutinho, H.D.M. *Psidium guajava* L., from ethnobiology to scientific evaluation: Elucidating bioactivity against pathogenic microorganisms. *J. Ethnopharmacol.* 2016, 194, 1140–1152

Rodríguez, M. O. **Molecular mechanisms associated with azole resistance in Candida species. Collection of Articles on Biochemistry. Genetics and Molecular Biology.** 2020, 1–5. 23. Pristov, K. E.; Ghannoum, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clin. Microbiol. Infect.* 2019, 25, 792–798.

Spampinato, C.; Leonardi, D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: Traditional and alternative antifungal agents. *Biomed Res. Int.* 2013, 2013. 25. Sharma, A.; Flores-Vallejo, R. C.; Cardoso-Taketa, A.; Villarreal, M. L. Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* 2017, 208, 264–329.

Thompson, A.L.; Pauli, D.; Tomasi, P.; Yurchenko, O.; Jenks, M.A.; Dyer, J.M.; Gore, M.A. **Chemical variation for fiber cuticular wax levels in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) evaluated under contrasting irrigation regimes.** *Ind. Crops Prod.*, 2017, 100, 153–162.

Tsang, P. W. K.; Bandara, H. M. H. N.; Fong, W. P. **Purpurin Suppresses *Candida albicans* Biofilm Formation and Hyphal Development.** *PLoS One.* 2012, 7, 1–8. 21.

Zuza-Alves, D. L.; Silva-Rocha, W. P.; Chaves, G. M. **An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches.** *Front. Microbiol.* 2017, 8, 1–25.