

AValiação DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE EXTRATOS NATURAIS FRENTE A LEVEDURAS ISOLADAS DE PACIENTES COM ONICOMICOSE

Andressa Gimenes Braga (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Lorena Rufato Rizzo, Karina Sakita; Daniella Faria; Patrícia de Souza Bonfim; Érika S. Kioshima (Co-orientador); Terezinha I. E. Svidzinski (Orientador), e-mail: terezinha.svidzinski@gmail.com

Laboratório de Micologia Médica/ Universidade Estadual de Maringá/ Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.

Área: Ciências Biológicas; subárea: Microbiologia, Microbiologia Médica

Palavras-chave: Micose de unha, extratos naturais, antifúngicos.

Resumo

Onicomicose, popularmente conhecida como micose de unhas, é uma infecção fúngica de unhas das mãos ou pés causada por fungos filamentosos dermatófitos, não dermatófitos ou também por leveduras. A terapia é limitada principalmente pelo tempo de tratamento. Desta forma, este trabalho tem o objetivo de estudar *in vitro* o potencial efeito antifúngico, citotóxico e anti-inflamatório de extrato de unha de gato e própolis frente a cepas padrão e isolados clínicos de leveduras do gênero *Candida* spp. isoladas de pacientes com onicomicose atendidos pelo Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas da cidade de Maringá. Os resultados mostram atividade antifúngica satisfatória para os dois extratos testados. A citotoxicidade foi moderada, e não houve influência sobre a liberação de óxido nítrico. Estes resultados incentivam novos estudos para aplicação dos referidos extratos na prática clínica.

Introdução

Leveduras do gênero *Candida* ganharam destaque entre os patógenos causadores de onicomicose por apresentarem potencial de virulência e manifestações clínicas nos quadros de paroníquia (KIOSHIMA et al., 2002; DAHDAH e SCHER, 2006). Em alguns casos, há grande desconforto para o paciente, cuja queixa principal é a dor que afeta negativamente o bem estar e a auto-estima (ARAUJO et al., 2003; DAHDAH e SCHER, 2006). Adicionalmente, situações de imunossupressão podem aumentar os riscos para o desenvolvimento desta micose de tratamento prolongado e alta taxa de recaídas e/ou reinfecção. Apesar da melhora no tratamento ocorrida nas últimas décadas, a grande limitação na terapia da onicomicose, seja oral ou tópica, é a penetração do antifúngico na unha, da qual depende o sucesso deste tratamento. Além disso, o curso prolongado de tratamento acaba por

desencorajar o paciente (DUARTE et al., 2005). O emprego de tratamentos antifúngicos com drogas alternativas tem sido muito estudado, destacando-se os extratos naturais como opção eficiente e de baixo custo. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi estudar o potencial antifúngico, citotóxico e antiinflamatório dos extratos *Uncaria tomentosa* (unha-de-gato) e própolis sobre leveduras padrão e isolados clínicos de onicomicose.

Materiais e métodos

Obtenção do extrato bruto de Uncaria tomentosa

O extrato bruto de *Uncaria tomentosa* (unha de gato), foi obtido por maceração e extração em solução hidroalcoólica. O lenho de unha de gato (UG) foi pesado (50 gramas) e adicionado inicialmente 80 mL da solução extratora (álcool 70%) e mantido em frasco âmbar por 14 dias, em temperatura ambiente e agitação randômica. Após seis dias, foi adicionado ao macerado mais 80 mL da solução extratora a fim de manter o lenho totalmente submerso na solução. O macerado foi filtrado e seu volume foi ajustado para 100 mL. Para a preservação das características originais, o extrato foi concentrado em rotaevaporador a vácuo, a 40 °C, até a metade do seu volume. O concentrado foi acondicionado em frascos específicos para a liofilização e congelado. A liofilização foi realizada de modo usual, a -60 °C e pressão de 0,1 mbar, mantendo as amostras protegidas da luz. O extrato bruto liofilizado (EBL) foi acondicionado em frasco âmbar e armazenado em dessecador até o momento do uso.

Extrato de Própolis

O extrato de própolis foi preparado e cedido pelo Laboratory of R&D of Drug Delivery Systems da UEM.

Teste de susceptibilidade ao extratos naturais e fluconazol

Os testes de susceptibilidade foram realizados através da metodologia de microdiluição em caldo, de acordo com documento M27-A3 do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI). Para o teste foram utilizadas quatro cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC): *Candida albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. glabrata* ATCC 90030. Foram utilizados também dois isolados clínicos obtidos de pacientes com onicomicose e atendidos no LEPAC-UEM: *C. parapsilosis* e *C. glabrata*.

Preparação dos extratos para o teste de susceptibilidade antifúngica

Para avaliação da atividade antifúngica do extrato bruto de *Uncaria tomentosa*, 10 mg do extrato bruto foi ressuspendido em solução hidroalcoólica (30%) e diluições seriadas (razão 2) foram feitas na placa de microtitulação a fim de obter dez concentrações diferentes, partindo de uma concentração de 5mg/ml (1:2) até a concentração de 0,009 mg/ml (1:1024). Em relação ao extrato de própolis, 100µL do extrato foi adicionado na primeira coluna da placa de microdiluição e a partir desta foram feitas

diluições seriadas (razão 2) até a décima coluna a fim de obter dez concentrações diferentes, 15% (1:2) na primeira coluna até 0,029% (1:1024) na décima coluna. Como droga de referência foi utilizado fluconazol, e as concentrações testadas seguiram a referência do documento CLSI M27-A3, sendo 64-0.125µg/mL.

Preparação do inóculo para o teste de susceptibilidade antifúngica

A partir de um cultivo de 24-48h das leveduras a serem testadas, foi preparada uma suspensão inicial a uma concentração de 2,5 a 5×10^6 UFC/mL, ajustada em câmara de Neubauer. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas a partir da suspensão inicial, para obtenção de inóculo final, em meio RPMI, contendo $0,5 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. Alíquotas de 100µL do inóculo final foram adicionadas a cada poço das placas de microtitulação contendo as dez diferentes concentrações do antifúngico diluídos em meio RPMI, chegando-se à concentração final desejada de antifúngico e inóculo. As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 24-48h. Para avaliar a Concentração Fungicida Mínima (MFC), subculturas de todos os poços foram plaqueadas em meio SDA e avaliado o crescimento após 24h de incubação a 35°C. A atividade antifúngica dos extratos foi avaliado através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) com redução do crescimento de aparentemente 90% em relação ao controle positivo (avaliação do crescimento fúngico com ausência das drogas avaliadas).

Citotoxicidade dos extratos de própolis e unha de gato em queratinócitos imortalizados (HaCat) e avaliação do potencial anti-inflamatório

Após confirmada a confluência superior a 80% da linhagem celular plaqueada, foram realizados os testes de citotoxicidade e liberação de óxido nítrico. A ação citotóxica do extrato de própolis e unha de gato foi investigada através do ensaio colorimétrico com MTT. A viabilidade celular foi realizada a partir do controle positivo (células sem extrato natural). As células HaCat também foram utilizadas para o ensaio de avaliação do potencial anti-inflamatório do extrato de unha de gato a partir da medida da liberação de óxido nítrico pelo método de Griess.

Resultados e Discussão

A partir da avaliação antifúngica da droga padrão (fluconazol), foi possível observar que as cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foram sensíveis e *C. glabrata* sensível dose-dependente. Além disso, os isolados clínicos foram sensíveis à referida droga. A *Uncaria tomentosa* é uma espécie rica em alcaloides, polifenóis e triterpenos derivados do ácido quinóico, acerca da qual já existem estudos para o tratamento de inflamações articulares, processos alérgicos e infecções de pele. A CIM para o extrato de *Uncaria tomentosa* em 24 e 48h, com a cepa padrão *C. parapsilosis* e isolado clínico, foi de 0,625 e 2,5 mg/mL, respectivamente. Já para *C. glabrata* houve diferença da CIM entre 24 e 48h. Em 24h, a CIM do isolado clínico de *C. glabrata* foi de 2,5mg/mL, porém, não houve atividade

antifúngica para a cepa padrão de *C. glabrata*. Em 48h não foi observado atividade antifúngica para *C. glabrata*. Para cepa padrão de *C. tropicalis* a CIM foi de 0,31mg/mL em 24h. Quanto ao própolis, sua aplicação contra fungos tem sido relatada e a opinião corrente é que o uso de preparações padronizadas de própolis é seguro e menos tóxico do que muitas outras drogas sintéticas (MALHOTRA et al., 2011). A CIM para cepas padrão foi: *C. parapsilosis* na concentração de 0,937%, *C. glabrata*, 1,875%, *C. albicans* e *C. tropicalis*, 7,5%. Já para os isolados clínicos, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*, as CIM foram de 1,875%. No ensaio de citotoxicidade do extrato de unha de gato, feito com duas linhagens celulares (HaCat e HUVEC), observou-se, para ambas, viabilidade celular sempre superior a 80% em concentrações do extrato iguais ou menores que 0,08mg/mL. Já para as concentrações de CIM expostas acima, a viabilidade ficou em torno de 42% para HUVEC e 45% para HaCat. Não houve alteração na liberação de óxido nítrico nas concentrações testadas no ensaio de sensibilidade antifúngica.

Conclusões

Foi possível observar que o extrato de unha de gato e própolis mostraram atividade satisfatória para pelo menos duas espécies de leveduras testadas, com destaque para a espécie *C. parapsilosis*, sendo essa a espécie mais isolada em casos de onicomicose. Os resultados incentivam novos estudos para aplicação desses extratos na prática clínica.

Agradecimentos

Fundação Araucária.

Referências

- ARAUJO, A. J. G.; BASTOS, O. M. P.; SOUZA, M. A. J.; OLIVEIRA, J. C. **Ocurrence of onychomycosis among patients attended in dermatologist offices in the city of Rio de Janeiro, Brazil.** An Bras Dermatol, v. 78, p. 299-308, 2003.
- DAHDAH, M. J.; SCHER, R. K. **Onychomycosis an Overview.** US Dermatology review, p. 1-3, 2006.
- DUARTE, M. C.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L.; DELARMELIA, C. **Anti-Candida activity of brazilian medicinal plants.** J Ethnopharmacol, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.
- KIOSHIMA, E. S.; OLIVEIRA, A. C. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. **Onicomicoses: do diagnóstico ao tratamento.** Arq. Ciênc. Saúde Unipar, v. 6, n. 2, p.159-163, 2002.
- MALHOTRA, N.; RAO, S. P.; ACHARYA, S.; VASUDEV, B. **Comparative in vitro evaluation of efficacy of mouthrinses against Streptococcus mutans, Lactobacilli and Candida albicans.** Oral Health & Preventive Dentistry, v. 9, n. 3, p. 261–268, 2011.