ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DO EXTRATO ETANÓLICO OBTIDO A PARTIR DAS CASCAS *RHIZOPHORA MANGLE* LINK CONTRA A LEVEDURA MODELO *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

IN VITRO ANTIFUNGAL ACTIVITY OF THE ETHANOLIC EXTRACT OBTAINED FROM RHIZOPHORA MANGLE LINK BARK AGAINST THE MODEL YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Marcello Henrique Martins de Almeida [1,2] , Murillo Alessandro do Nascimento[2], Deborah Ribolli Ferraz[2], Luciana Lopes Guimarães[1,2]

[1] Curso de Biomedicina, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Santa Cecília.
[2] Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, Universidade Santa Cecília.
E-mail para contato: marcellohmaprofissional@gmail.com

RESUMO – O número limitado de antifúngicos disponíveis e a relação da resistência aumentada a eles leva a um interesse pela pesquisa e desenvolvimento de novos compostos com atividade antifúngica. O presente estudo avaliou o potencial antifúngico in vitro de extratos ricos em compostos fenólicos obtidos a partir das cascas de Rhizophora mangle Link contra a espécie não-patogênica Saccharomyces cerevisiae. O extrato foi obtido através do método de maceração com etanol absoluto. Para realização dos testes de susceptibilidade foi utilizado o método de microdiluição, de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo documento CSLI M27 A-3 modificado. Os resultados demonstraram potencial antifúngico do extrato na concentração de 10 mg/mL, sendo esta definida como a Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Palavras-chave: *Rhizophora mangle*; Antifúngicos; *Saccharomyces cerevisiae; Candida* spp.

ABSTRACT – The limited number of antifungals available and the increased resistance to them has led to an interest in research and development of new compounds with antifungal activity. The present study evaluated the in vitro antifungal potential of extracts rich in phenolic compounds obtained from the bark of Rhizophora mangle Link against the non-pathogenic species Saccharomyces cerevisiae. The extract was obtained by the maceration method with absolute ethanol. The microdilution method was used to perform the susceptibility tests, according to the parameters established by the modified CSLI M27 A-3 document. The results demonstrated antifungal potential of the extract at a concentration of 10 mg/mL, which is defined as the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)..

Keywords: *Rhizophora mangle*; *Antifungal*; *Saccharomyces cerevisiae; Candida* spp.

Tipo do trabalho: (X) Iniciação científica ( ) Iniciação tecnológica ( ) Extensão

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Saccharomyces* é classificado como levedura e é muito utilizado na indústria alimentícia, por conta de sua capacidade de fermentação, e possui sua relevância no campo farmacêutico, sendo usado na fabricação de inúmeros fármacos e processos, como a produção de insulina, vacina para hepatite B, outros insumos para tratamento da saúde humana, e também reconhecido como fonte de biocombustíveis e produtos biotecnológicos, possuindo uma longínqua relação com a história e desenvolvimento da raça humana como um todo. Foi o primeiro organismo eucarionte a ter seu genoma sequenciado (em 1996) e segue sendo o organismo com genoma mais completo e caracterizado, e assim possuí uma fácil manipulação genética, capacitando a análise e geração de mutantes, tanto de genoma nuclear quanto mitocondrial. É considerado um fungo relativamente inofensivo já que sua capacidade patogênica é quase nula por maior parte das cepas não resistirem temperaturas acima de 37ºC, assim se tornando um dos primeiros organismos GRAS (Geralmente Reconhecidos Como Seguros) e o primeiro Organismo Geneticamente Modificado (OGM) utilizado para processos de fabricação alimentar e aditivos em rações (1)

O *Saccharomyces cerevisiae* não é um fungo com capacidades patogênicas contra o ser humano, entretanto, é conhecido por possuir inúmeras semelhanças com a *Candida spp*, fungo patogênico que representa mais de 78% das infecções fúngicas hospitalares, conhecidas como candidíases, doença que pode afetar as mucosas ou pele, causando ferimentos leve, ou até mesmo afetando a corrente sanguínea, desenvolvendo uma infecção extremamente grave, denominada candidemia ou candidíase alérgica, com lesões semelhantes as dermatofitoses (2), portanto, será utilizado como fungo modelo para ser testada a capacidade antifúngica do extrato rico em compostos fenólicos obtido a partir das cascas da espécie vegetal *Rhizophora mangle* Link.

Espécies do gênero *Rhizophora*, são conhecidas pelas propriedades medicinais de seus taninos. A *Rhizophora mangle* é uma das espécies de plantas mais conhecidas dentre os manguezais brasileiros, sendo popularmente conhecida como “mangue-vermelho” dentre outras denominações populares e, é utilizada na medicina popular contra inúmeras patologias, assim como suas capacidades antifúngicas contra simples micoses (3).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Cascas de *R. mangle* foram coletadas num bosque do estuário de Santos (23º53´02,4" S 46º21´58,6" W). O material foi coletado com autorização obtida do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade/Ministério de Meio Ambiente sob número 50908-1.

O material foi seco em estufa por sete dias a 40ºC, após esse período as amostras foram trituradas e moídas. A extração dos compostos foi realizada por maceração utilizando etanol absoluto (1:4) (p/v), por sete dias. As amostras foram filtradas, secas em rotaevaporador, e posteriormente quantificadas por gravimetria (pesagem do extrato seco), obtendo-se então o extrato etanólico para os testes de susceptibilidade.

As leveduras *de S. cerevisiae* foram cultivadas em caldo Sabouraud-dextrose em temperatura de 35ºC, com ao menos três repiques sucessivos de 24 horas previamente ao experimento. Para a realização dos ensaios de susceptibilidade *in vitro* aos extratos de *R. mangle*, no dia do experimento as leveduras foram contadas e a suspensão do inóculo foi ajustada para 2,5 x 10^3 céls./mL em caldo Sabouraud-dextrose.

O extrato de *R. mangle* foi re-suspensos em DMSO 30% obtendo-se a concentração final de 100 mg de extrato seco/mL, sendo então esta solução denominada de "solução estoque".

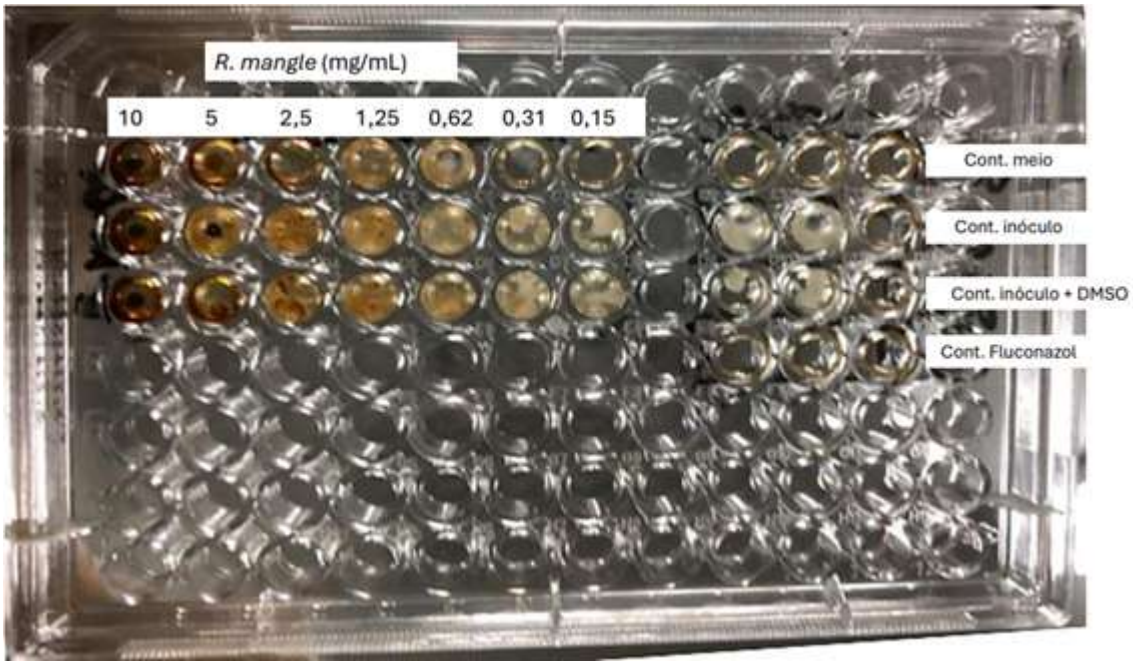
Para realização dos testes de susceptibilidade para a avaliação do efeito antifúngico dos extratos de *R. mangle*, foi utilizado o método de microdiluição, de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo documento CSLI M27 A-3 (4) com modificações. Os extratos de *R. mangle* foram testados em concentrações que variam de 1,25 a 10 mg/mL e as microplacas serão incubadas a 35º C por 24h. A menor concentração capaz de inibir o crescimento do microrganismo nos poços foi identificada como a Concentração Mínima Inibitória (CIM) da substância para este microrganismo.

Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo realizados controles com os diluentes dos inibidores (controle-inóculo) em suas concentrações finais. Adicionalmente, para cada ensaio, foram realizados controles com fluconazol (64 μg/mL).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que existe potencial antimicrobiano no extrato etanólico obtido a partir das cascas de *R. mangle* contra a levedura *S. cerevisiae* - atividade antifúngica observada *in vitro*, na concentração de 10mg/mL de extrato (para três réplicas), sendo esta definida como a Concentração Inibitória Mínima (CIM) (figura 1).

Figura 1. Resultado das análises da atividade antifúngica (fungistática) do extrato obtido a partir das cascas de R. mangle em culturas de S. cerevisiae A seta vermelha indica a Concentração Inibitória Mínima (CIM) obtida para o extrato.



A atividade antifúngica observada possivelmente se deve à presença de compostos fenólicos (taninos) presentes em cascas de *R. mangle* (5). Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional no tratamento de diversas moléstias, como diarreias, queimaduras e feridas, gastrite, problemas relacionados ao trato geniturinário e processos inflamatórios em geral. Testes in vitro com extratos ricos em taninos ou com taninos puros têm identificado diversas atividades biológicas dessa classe de moléculas como ação fungicida (6, 7).

Sendo assim, os resultados obtidos no presente estudo revelaram o potencial antifúngico do extrato etanólico obtido a partir das cascas de *R. mangle*.

4 CONCLUSÃO

Conforme proposto e pesquisado, os resultados obtidos no presente estudo revelaram o potencial antifúngico do extrato etanólico obtido a partir das cascas de *R. mangle*.

Os resultados obtidos nesta proposta de pesquisa poderão levar ao isolamento de novas de substâncias, obtendo-se candidatos à fármacos antifúngicos mais específicos e eficazes para o tratamento de infecções fúngicas causadas por fungos patogênicos.

Agradecimentos: O autor agradece à Agência de Fomento CNPq pelo apoio concedido durante o desenvolvimento deste estudo, na forma de bolsa de iniciação científica.

5 REFERÊNCIAS

1. COTOYA, A. Saccharomyces cerevisiae. Biology Dictionary. Disponível em https://biologydictionary.net/saccharomyces-cerevisiae/ acesso em 20.08.23
2. DO NASCIMENTO, Adriana Rocha. Infecção relacionada à assistência à saúde causada por leveduras do gênero Candida [monografia]. Belo Horizonte: Especialização em Microbiologia Aplicada às Ciências da Saúde. Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.
3. ALMEIDA, V. S.. Investigação da atividade citotóxica, antibacteriana e imunomoduladora do extrato metanólico de Rhizophora Mangle Linneus (Rhizophoraceae) [dissertação]. Recife: Mestrado em Morfotecnologia. Universidade Federal de Pernambuco, 2017.
4. CSLI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, approved standard, M27-A3, 3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
5. DE FARIA, Felipe Meira et al. Effects of Rhizophora mangle on experimental colitis induced by TNBS in rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2012, 2012
6. HARBORNE JB, GRAYER RJ. A Survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. Phytochemistry; 37:19-42, 1994.
7. SANTOS S.C., MELLO J.C.P. Taninos. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. Eds. Simões MO, Guerra MP. Ed UFRGS, pp 615-656, 2004.