

# **CONIC·SEMESP** **13º Congresso Nacional de Iniciação Científica**

Anais do Conic-Semesp. Volume 1, 2013 - Faculdade Anhanguera de Campinas - Unidade 3. ISSN 2357-8904

**TÍTULO:** AVALIAÇÃO DO EFEITO DA POMADA E DO EXTRATO ELABORADO COM AS FOLHAS DE MAYTENUS ILICIFOLIA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

**CATEGORIA:** CONCLUÍDO

**ÁREA:** CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE

**SUBÁREA:** ENFERMAGEM

**INSTITUIÇÃO:** CENTRO UNIVERSITÁRIO ANHANGUERA DE CAMPO GRANDE

**AUTOR(ES):** KAREN SILVA DOS SANTOS

**ORIENTADOR(ES):** KATIUCIA OLISKOVICZ, ROSEMARY MATIAS

Realização:



Apoio:



## AVALIAÇÃO DO EFEITO DA POMADA E DO EXTRATO ELABORADO COM AS FOLHAS DE *Maytenus ilicifolia* SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

### Resumo

Muitas espécies vegetais têm contribuído e sendo empregada de forma intensa e significativa na terapêutica, entre estas espécies está a *Maytenus ilicifolia* (cancorosa), uma espécie vegetal nativa da região sul do Brasil. Apresenta propriedades cicatrizante, antifúngica, antiulceroativa, antineoplásica. O presente trabalho avaliou o potencial antifúngico do extrato etanólico e da pomada elaborados a partir das folhas de *M. ilicifolia*, aferindo sua eficiência sobre a inibição de crescimento sobre fungos fitopatogênicos. Para o uso do extrato bruto, elaborou-se uma solução estoque a 0,2% das folhas, aplicando no meio BDA concentrações de 200µg/mL, 400 µg/mL, 800 µg/mL, 1600 µg/mL, 2000 µg/mL e 4000 µg/mL, para o controle usou o meio BDA e DMSO. Para a pomada elaborada a partir do extrato bruto, utilizou concentrações de 200µg/mL, 400µg/mL e 600µg/mL dos veículos vaselina e lanolina, vertendo 10mL do meio na placa e incubados em B.O.D a 25°C, realizando medição diária. Os fungos isolados para o experimento foram *aspergillus sp*, *penicillium sp* e *Candida albicans*. O crescimento micelial foi avaliado quando a testemunha alcançou a borda da placa. Os resultados obtidos na avaliação da atividade antifúngica “in vitro” do extrato da espécie vegetal apontou inibição significativa na concentração 1600µg/mL. Os ensaios realizados com a pomada não apresentou resultado significativo, devendo o mesmo ser testados com concentrações mais elevadas. O extrato bruto da planta em estudo apresentou potencial antifúngico frente aos fungos testados.

**Palavras-chave:** *Aspergillus*, extrato etanólico, fitopatogênico, plantas medicinais, *Penicillium*.

### Introdução

Os estudos das propriedades medicinais de diversas espécies vegetais têm contribuído para o surgimento de fitoterápicos com atividades e efeitos farmacológicos, entre elas, está presente a *Maytenus ilicifolia* (cancorosa), espécie perene da família Celastraceae, nativa da região sul do Brasil que apresenta porte arbóreo-arbustivo, com altura de 2 a 3 m, caule lenhoso e espalhado que ostenta folhas em forma de lanças pontiagudas, dentadas, medindo de 4 a 12 cm de comprimento, os frutos são cápsulas achatadas com dois compartimentos que abrigam as sementes (ZOONEWS, 2003).

Apresentando relevância na produção de fitoterápicos, a ser aplicado no tratamento de úlceras gástrico, processo inflamatório, antiespasmódico, anticancerogênica, cicatrizante de feridas e antimicrobiana, essa espécie possui grande potencial para gerar produtos terapêuticos e encontra-se na Relação

Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema único de Saúde (RENISUS) divulgada em pelo Ministério da Saúde, (BRASIL, 2009).

A Variedade de constituintes químicos presente nas folhas da espécie vegetal mencionada possibilita a realização de estudos focados. Os taninos condensados constituinte majoritário nas folhas da *M. ilicifolia* é utilizado como marcador no controle de qualidade de extratos e medicamentos fitoterápicos sendo avaliado por diversas técnicas de desenvolvimento tecnológico (SOARES et al., 2004).

A diversidade fungica encontradas é ampla levando em consideração que os gêneros *Penicillium* *Aspergillus* desenvolvem diversas doenças. Plantas medicinais têm apresentando diversas aplicações, principalmente atividade antifungica evidenciadas em seus extratos, sendo importante levar em consideração a aplicação desse mecanismo para o tipo de doença (SILVA et al., 2005).

As doenças desenvolvidas pelos fungos da espécie *Aspergillus* são decorrentes em sua maioria da ingestão de sementes contaminadas que são ingeridas pelo homem ocasionando doenças graves como reação de hipersensibilidade pela inalação de esporos, que proliferam de maneira invasiva através de micélios na luz de vias respiratórias já lesadas, e são diferenciadas em alérgica, colonizante e invasiva, sendo a última, de difícil de diagnostico devido a carência na identificação do fungo no escarro e no sangue e até letal (MIDORIKAWA, 2009).

Por acometer pacientes com imunossupressão severa e prolongada, as doenças ocasionadas por fungos desenvolver caráter invasivo e oportunista, evoluindo para invasão vascular podendo disseminar para os demais tecidos como achados doenças cerebrais, endocardite, lesões cutâneas e ósseas.

Os fungos *Aspergillus sp* e *Penicillium sp* são considerados apenas agentes contaminantes e não causais, seus esporos apresentam morfologia semelhante, o que acaba tornando inviável sua identificação em nível de gênero Alguns esporos de fungos apresentam morfologia

No entanto, estudos realizados comprovam que a quebra da barreira epitelial, é fator imprescindível como via de contaminação exógena e causador de infecções como a pneumonia e a sinusite e principal motivo de morte por infecção em pacientes com leucemia e transplantes de medula óssea. Como agente causador da aspergiloma, patologia que destina a formação de uma massa de fungos, composta

por fibras micóticas, responsáveis pela coagulação sanguínea e leucócitos (GOMES, 2003).

Dentre os fungos encontrados como causadores de úlcera corneana icótica no Brasil, de acordo com a incidência, estão *Fusarium sp.* e *Aspergillus sp.* seguidos por *Candida sp.*, *Cephalosporium sp.* e *Penicillium sp.* Algumas espécies de *Aspergillus* causam doenças em humanos e animais, e podem ser patogênicos. *Aspergillus fumigatus* e outras espécies de *Aspergillus* são tão importantes quanto a *Candida spp* como causadores de infecções fúngicas. Estes fungos, cosmopolitas, podem causar também reações de hipersensibilidade, pela inalação dos esporos, e proliferação não invasiva dos micélios na luz das vias respiratórias já lesadas (GOMES; ALVES, 2003).

Podem ser diferenciadas três formas de aspergilose humana: alérgica, colonizante e invasiva. Além disso, a toxina de *Aspergillus flavus*, uma espécie que não parece infectar seres humanos, pode constituir um importante carcinógeno hepático quando ingerido com alimentos. A aspergilose invasiva é difícil de diagnosticar, pois o *Aspergillus* é raramente demonstrável no escarro e no sangue (GOMES, 2003)

A *Candida albicans* está entre os muitos organismos que vivem na boca e no sistema digestivo humano. Em circunstâncias normais, ela pode ser encontrada em 80% da população humana sem que isso implique em quaisquer efeitos prejudiciais a sua saúde, embora o excesso resulte em candidíase. É o patógeno da espécie mais frequente, causando mais de dois terços das infecções (AMARAL et al, 2005).

As variações apresentadas pelos fungos são amplas incidindo com as sazonalidade, temperatura, umidade relativo ar, presença de atividade humana e tipo de climatização dos ambientes (GOMES, 2003).

O mecanismo de resistência criado pelos microrganismos fitopatogenicos é resultante de um processo químico decorrente de malefícios trazidos pelo uso indiscriminado de pesticidas no controle de pragas e doenças têm ocasionado problemas ambientais, contaminação de alimentos sendo assim é necessário desenvolver saídas alternativas aplicando o uso de produtos naturais de origem vegetal, que apresente baixo custo e elevada eficácia e efeito inibitório contra fitopatogenos e diminuindo os danos ao meio ambiente (SOUSA et al., 1991; DIAS,1993).

Visando eliminar esses agentes agressivos do ambiente e diminuir os impactos causados em diversas espécies vegetais plantas, extratos e produtos derivados de vegetais, têm sido estudados quanto à eficácia no controle dessas doenças, levando em consideração a ampla variedade de espécies que apresentam propriedade antifúngica em seus extratos para tanto, considera-se fatores como temperatura, estágio vegetativo e idade.

Por apresentar mecanismos significativos no processo de cicatrização de feridas quando tratada com a pomada a base do extrato ativo (extrato bruto), e ter mostrado atividade contra o desenvolvimento fungos de diversos gêneros em ensaios iniciais.

### **Objetivos**

Avaliar o efeito dos extratos e da pomada elaborada com as folhas de *Maytenus ilicifolia* no tratamento de patologias causadas por fungos, propondo a elaboração de um produto que acelere o processo de recuperação tecidual, eliminando contaminação por agentes patógenos.

### **Metodologia**

Este experimento foi realizado no laboratório de Pesquisa em Produtos Naturas e laboratório de Manejo Intergrado de Doenças Universidade Anhanguera – Uniderp, Unidade Agrárias, em Campo Grande – MS, no período de Janeiro de 2013 a novembro de 2013. As folhas de *Maytenus ilicifolia* para a realização do experimento foi obtida em de Campo Grande-MS, secas em estufa de circulação de ar, na temperatura de 40° C, trituradas, tamizados e armazenadas em frascos para posterior realização de testes. Para a preparação dos extratos foi utilizado 20g das folhas trituradas Serão utilizados no experimento com os fungos.

### **Desenvolvimento**

**5.1 Análise fitoquímica:** Para realização das análise fitoquímica, via úmida, foi preparado uma solução etanólico a 20% a partir da matéria seca. Para os testes de saponinas, índice afrosimétrico, alcalóides e glicosídeos cardiotônicos utilizou-se da droga seca. A metodologia empregada foi adaptada de Matos (2009); Costa (2002) e Wagner e Bladt (2009).

**5.2 Preparação dos extratos brutos:** As folhas secas em estufa circuladora de ar a 40 °C após serem trituradas foram submetidas à extração por Banho ultrasonic com

etanol 99% (100mL), após evaporação do solvente em rota-vapor a 30°C, pesou-se o extrato para cálculo de rendimento. O extrato bruto foi utilizado na proporção de 0,2g (extrato bruto), 5 µL de DMSO e completado com solução hidroalcoólica 20% para 100mL em balão volumétrico.

**5.3 Preparação da pomada:** Após obter o extrato bruto etanoico da planta a 20%, este foi incorporado ao veículo à base de lanolina/vaselina (1:1). A concentração estabelecida foi de 0,2% de ativo (extrato bruto) e 0,2% dos veículos. Para a manipulação do medicamento foram seguidas as normas de boas práticas de manipulação de fórmulas, com assepsia completa da bancada e vidrarias com álcool 70%, para isto foi necessário utilizar de toda a paramentação necessária para realizar o procedimento evitando assim possíveis contaminações ao produto (ANVISA, 2005).

**5.4 Atividade antifúngica “in vitro”:** os fungos estudados foram cedidos e registrados na coleção de culturas Maria de Menezes da Universidade Federal Rural de Pernambuco. As colônias puras dos fungos *Aspergillus sp* e *Penicillium sp*, foram previamente repicados para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-agar) e mantidas em câmara climática tipo BOD durante 10 dias. retirados de colônias puras com sete dias de idade, no centro da superfície do meio de cultura com os respectivos tratamentos. Posteriormente, as placas de Petri foram vedadas com filme plástico e incubadas em câmara BOD a uma temperatura de 25° C, com fotoperíodo de 12 horas.

Uma alíquota de cada uma das amostras foi adicionada, separadamente, ao meio de cultura BDA fundente, de maneira que se obtivessem as concentrações de 200 µg, 400 µg, 800 µg e 1600 µg, 2000 µg, e 4000 µg em 100mL de meio, sendo o mesmo vertido em placas de Petri no volume correspondente a 10mL por placa. Após a solidificação do meio, repicou-se, no centro de cada placa, um disco de micélio com aproximadamente 5cm de diâmetro retirado de uma das colônias puras com sete dias de idade, inseridos no centro da superfície do meio de cultura. As testemunhas foram: o meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e o (BDA+ DMSO).

As placas de As placas permaneceram incubadas em BOD a temperatura de 22±2°C. As avaliações do efeito do extrato foram feitas diariamente aos 13 dias,

realizando duas medidas perpendiculares do diâmetro das colônias para *Aspergillus sp* e *Penicillium sp*. Como testemunha placas contendo apenas BDA e disco de micélio e, também, o meio contendo BDA acrescido de solução de 5 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 100 mL de solução hidroalcoólica a 20%, na concentração de 500µg.mL<sup>-1</sup>.

A partir dos dados de crescimento micelial foi calculada a porcentagem de inibição do crescimento (PIC) para cada uma das amostras em relação a testemunha (MENTEN et al., 1976).

$$PIC = \frac{[\text{diâmetro da testemunha} - \text{diâmetro do tratamento}]}{\text{diâmetro da testemunha}} \times 100 = \%$$

Com delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos e quatro repetições. A análise estatística dos resultados obtidos foi realizado por meio do teste de Turkey (5%), utilizando o programa BIOESTAT.

### Resultados

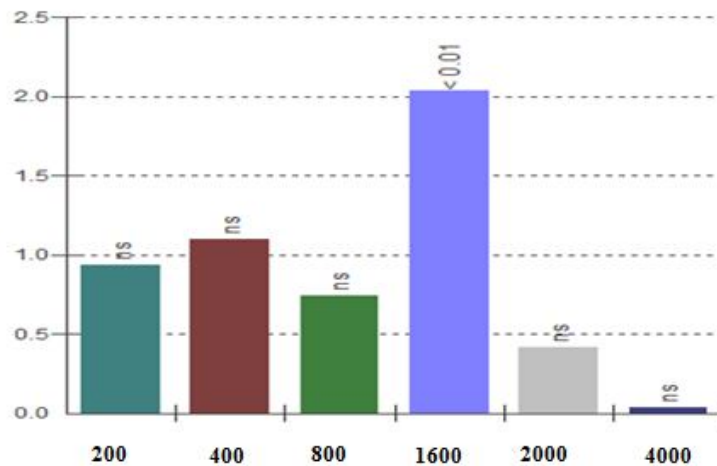
As análises fitoquímicas realizadas com partes áreas de *M. ilicifolia* apontou a presença de diversos constituintes químicos compostos fenólicos, flavonoides entre outros taninos condensados que são usados como marcadores no controle de qualidade de extratos e medicamentos fitoterápicos (SOARES et al., 2004), conforme figura 1.

**Figura1:** Resultado das análises fitoquímicas realizadas com as partes aéreas (folhas e caule) de *M. ilicifolia*.

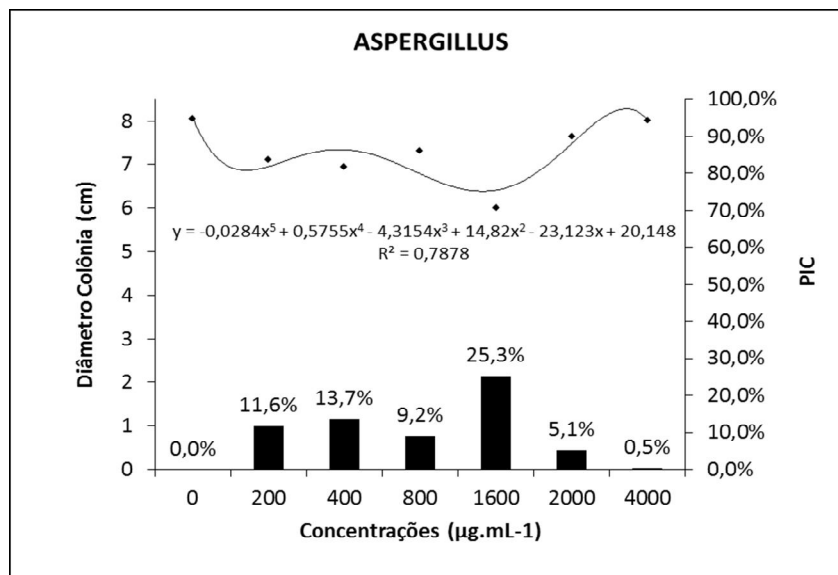
	Extrato Etanólico
Compostos fenólicos	+++
Taninos	+++
Flavonoides	+
Cumarina livre	+
Antocianina	-
Antraquinonas livres	+
Esteróides	+++
Triterpenos livres	+++
Alcaloides	+
Saponinas	-
GlicosídeoCianogênico	-
Glicosídeo Cardiotônicos	-
Açúcares redutores	-
Grau Brix	0
pH	4,6
Cor	verde

Presença (+) e ausência (-): fortemente positivo (+++); moderadamente positivo (++); fracamente positivo (+).

Os resultados das análises de variância despontaram interação significativa crescimento micelial dos isolados patógenos testados no meio de cultura contendo o extrato etanólico de *M. ilicifolia* na concentração de 1600µg/mL apresentou inibição significativa de 30%, conforme figura 1 e 2. Na concentração de 1600µg/mL o extrato de *M.ilicifoilia* levou a uma inibição superior do crescimento do aspergillus.



**Figura 2.** Avaliação “in vitro”do efeito do extrato bruto de *M. ilicifolia* sobre o crescimento micelial de *Aspergillus sp* no período de 13 dias.



Analisando a maior concentração pode-se constatar que não houve inibição, devido aos princípios antifúngicos ativos. Estudos similares realizado com extrato etanólico de folhas inibiu o crescimento micelial na concentração de 10%, possuindo atividade contra o fungo *Aspergillus sp* (CUNICO et al., 2002) . Ressalta que ao induzir o experimento aplicação de concentrações mais elevadas, verificou-se que não houve



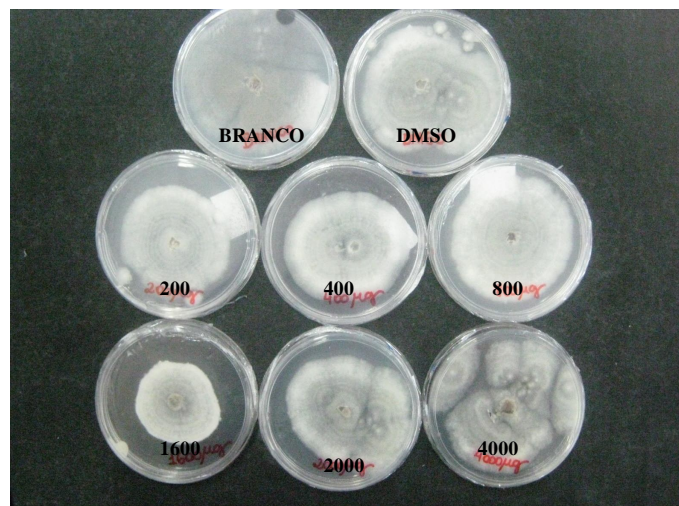
resultados satisfatórios, pois ao comparar a um fármaco é possível mencionar que a dose a ser administrada vai determinar o índice terapêutico, estabelecendo equilíbrio nos limites (GOODMAN, 2005).

**Figura 3.** Desenvolvimento dos patógenos em meio BDA acrescidos de extrato de *Maytenus ilicifolia*

	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Aspergillus sp.</i>
<b>200</b>	7,92 <sub>a</sub>	7,1 <sub>ab</sub>
<b>400</b>	7,85 <sub>a</sub>	6,95 <sub>ab</sub>
<b>800</b>	7,99 <sub>a</sub>	7,31 <sub>ab</sub>
<b>1600</b>	8,07 <sub>a</sub>	6,01 <sub>b</sub>
<b>2000</b>	7,77 <sub>a</sub>	7,64 <sub>a</sub>
<b>4000</b>	7,05 <sub>a</sub>	8,01 <sub>a</sub>
<b>Test</b>	7,99	8,05 <sub>a</sub>
<b>CV (%)</b>	7,99 <sub>a</sub>	9,55

figura 3 – Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Tukey- 5%). Médias de quatro repetições casualizadas. A inibição do crescimento micelial de patógeno frente ao extrato, apenas na concentração de 1600µg/mL para o fungo *Aspergillus*, sendo as obtidas pela comparação das médias das colônias fungicas do tratamento com as testemunhas (Branco e DMSO).

**Figura 4.** Avaliação do crescimento micelial do fungo *Aspergillus* frente ao extrato etanólico de *M. ilicifolia*.



**Figura 4-** Extrato de *M. ilicifolia* nas concentrações de 200µg, 400 µg, 800 µg, 1600 µg, 2000 µg, 4000 µg comparados ao teste Branco e DMSO.

### Considerações Finais

A presença de constituintes químicos comprova as propriedades curativas. Com os resultados apresentados, conclui-se que o extrato etanólico bruto das folhas

de *M. ilicifolia*, inibiu o crescimento micelial nas concentrações testadas apresentou inibição o crescimento micelial do fungo *Aspergillus sp.* O estudo comprova a eficácia da planta medicinal em estudo empregada na terapêutica por apresentar alto potencial antifúngico frente ao desenvolvimento de fungos, sendo observado na concentração intermediária do extrato.

### **Fontes Consultadas**

AMARAL, M. F.Z.J.; BARA, M.T. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DE PLANTAS SOBRE O CRÉSCIMENTO DE FITOPATÓGENOS.

BRASIL, Regulamento da ANVISA pelo Decreto nº 3.029, de 16 de abril de 1999, c/c o art. 111, inciso I, alínea “e” do Regimento Interno aprovado pela Portaria nº 593, de 25 de agosto de 2000, republicada no DOU de 22 de dezembro de 2000, em reunião realizada em 11 de abril de 2005.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Lisboa: Calouste Gulbenkian. 2002.

CUNICO, M. M.; CIRIO, G.M.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D.; MONTRUCCHIO, D.P.; AUER, C.G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Contribuição ao estudo da atividade antifúngica de *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reiss., *Celastraceae*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 12. n. 2, p. 69-73. jul./dez. 2002.

DIAS, C. R.; SCHWAN, A. V.; EZEQUIEL, D.P.; SARMENTO, M. C. FERRAZ, D. Efeito de extratos aquosos de plantas medicinais na sobrevivência de juvenis de *meloiodogyne ingognita* **Nematologia Brasileira**. Brasilia, v. 24, n.2,p.203-210, 2000.

GOMES, F. S.; MARCO, A.A. Creatites fúngicas Spontaneous funça corneal ulcer as an ocular manifestation of Aids. **American Journal of Ophthalmology**

GOODMAN, GOODMAN, L.S. & GILMAN, A. - **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. McGraw Hill - 10 ed, 2005.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. Fortaleza: Edições UFC, 2009.

MENTEN, J. O. M.; MINUSSI, C.C.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. “in vitro”. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.1, n.2, p.57-66, 1976.

MIDORIKAMA, G. E. O. Desenvolvimento de um método de PCR específico pra detecção de *Aspergillus flavus* aflatoxigênico em Grãos Brasileiros. 2009. 146. Universidade Católica de Brasília, 2009.

MINISTÉRIO DA SAUDE. **Programa nacional de plantas Medicinal e fitoterápico**. Brasília, 2009. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos / MS. Disponível em <http://www.saude.gov.br/bvs>. n.2, v.37,p. 302-303, 2003. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Supl. v.2, n.2, p.5- 8, 2005.

SILVA, F. M.; OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L.; FERREIRA, H. D.; CORREA, R.G;

SILVA, C.C. Estudo fitoquímico e atividade antibacteriana de *Palicourea rígida* (Rubiaceae). **Congresso de pesquisa**, ensino e extensão da UFG; XIII Seminário de Iniciação Científica; Goiânia, Brasil, 2005.

SOARES, L.A.; OLIVEIRA, A.; ORTEGA, G.; PETROVICK, P.R. Development and validation of a LC- method for determination of catechin and epicatechin in aqueous extractives from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.36, n.4, p. 787-790, 2004.

SOARES, L. A. L.; Oliveira, A. L.; Ortega, G.G.; Petrovick, P.R.; **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 2006. Dissertação (mestrado) – Universidade Católica de Brasília, 2009.

SOUZA- FORMIGONI, M. A. O.; OLIVEIRA, M.G.M.; MONTEIRO, M.G.; SILVEIRA-FILHO, N. G.; BRAZ, S.; CARLINI, E. A. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v.34, n.1, p. 21-27, 1991. Disponível em: <[http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1753784](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1753784)>. Acesso em 12 set.2012.

WAGNER, H.; BLADT. S. **Plant drug analysis**. 2. ed. New York: Springer Verlag, 2009.

ZOONEWS. Disponível em <http://www.zoonews.com.br/noticias.php?dnoticia>. Acesso em 14 out.2011.