



## Atividade antifúngica de extratos de plantas utilizados por agricultores familiares como antimicrobiano\*

Antifungal activity of medicinal plants with traditional used as antibiotic

Luiz Filipe Damé Schuch<sup>1,4</sup>, José Maria Wiest<sup>2</sup>, Élen Nunes Garcia<sup>3</sup>, Luciana Souza Prestes<sup>1</sup>, Renata da Costa Schramm<sup>1</sup>, Helen Coimbra<sup>1</sup> & Mário Carlos de Araújo Meireles<sup>1</sup>

### RESUMO

Plantas com atividades medicinais têm sido utilizadas pelo homem ao longo de toda a sua História. Muitas delas são referidas para tratamento e controle de enfermidades infecciosas animais e humanas, inclusive em dermatites. Este trabalho busca avaliar a atividade antifúngica de plantas, utilizadas por agricultores do Rio Grande do Sul, como antimicrobianos. Extratos hidralcoólico (EHA) e decocto (DEC) de cinco plantas, identificadas como *Baccharis* grupo *trimera*, *Bidens pilosa*, *Eucalyptus* spp., *Polygonum punctatum* e *Tagetes minuta*, foram avaliados frente a seis amostras de três espécies de dermatófitos – *Microsporum gypseum*, *Microsporum canis* e *Trichophyton mentagrophytes* –, sempre uma amostra de campo e uma padrão. O método utilizado foi o da diluição em meio líquido. Todos os EHAs apresentaram atividade antifúngica frente às seis amostras testadas, sendo *P. punctatum* e *T. minuta* os mais efetivos ( $p=0,0002$ ). Entre os DEC, apenas *B. grupo trimera* e *P. punctatum* apresentaram atividade antifúngica. Esses resultados reafirmam a possibilidade de aplicação de extratos dessas plantas no tratamento e controle de dermatites, onde dermatófitos estejam envolvidos.

**Descritores:** dermatófitos, plantas medicinais, antifúngico.

### ABSTRACT

Plants with medicinal indication have been used for the man throughout all its History. Many of them are related for treatment and control of animal infectious diseases and human beings, also in dermatitis. This work objected to evaluate the antifungal activity of plants used by agriculturists of the Rio Grande do Sul as antimicrobial. Extracts hidroalcoholic (EHA) and decoction (DEC) of five plants, identified as *Baccharis* group *trimera*, *Bidens pilosa*, *Eucalyptus* spp., *Polygonum punctatum* and *Tagetes minuta* had been evaluated front the six samples of three species of dermatophytes: *Microsporum gypseum*, *Microsporum canis* and *Trichophyton mentagrophytes*, always a sample of field and a standard. The used method was of the dilution in broth. All the EHAs had presented antifungal activity front the six tested samples, being *P. punctatum* and *T. minuta* most effective ( $p=0,0002$ ). The DEC of *B. grupo trimera* and *P. punctatum* only presented antifungal activity. These results reaffirm the possibility of extract application of these plants in the treatment and control of dermatitis where dermatophytes are involved.

**Key words:** dermatophytes, medicinal plants, antifungal.

## INTRODUÇÃO

A dermatofitose é uma enfermidade infecto-contagiosa causada por um grupo de fungos denominado dermatófitos, interrelacionados pela similaridade morfológica, fisiológica e de patogenicidade, que parasitam a queratina dos pêlos, peles, unhas, cascos e penas [8, 9]. *M. canis* é o principal responsável pelos casos zoonóticos, responsável por 30% de todos os casos de microsporose e 15% de todos os casos de dermatofitose em humanos. Aproximadamente, 50% de humanos expostos a gatos infectados, sintomáticos ou assintomáticos, adquirem a infecção [7,10,11,15].

As medidas de controle utilizadas nas dermatofitoses visam, principalmente, a interferir na cadeia de transmissibilidade da enfermidade, podendo ser utilizadas medidas higiênico-sanitárias e medidas quimioterápicas. Porém, controlar as dermatofitoses é particularmente difícil, devido à existência de animais clinicamente normais, mas que carregam em seu pêlo o fungo [16,17,21].

A prospecção de práticas profiláticas ou curativas, na cultura tradicional, para essas enfermidades, adquire importância devido ao aspecto zoonótico da enfermidade, da reduzida disponibilidade de drogas antifúngicas eficazes que, em geral, são caras e com dose tóxica muito próxima à dose terapêutica [2,3].

Neste trabalho, através do cálculo de concentração inibitória mínima (CIM), pretendeu-se avaliar a atividade antifúngica de extratos brutos de plantas, com indicação medicinal, frente a microrganismos causadores de dermatofitoses em humanos e animais.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O resgate etnográfico e a seleção das espécies de plantas para este trabalho foram realizados a partir de método participativo, em Assentamento da Reforma

Agrária, com referente termo de consentimento livre e esclarecido firmado com os informantes. As amostras de plantas utilizadas foram obtidas a partir da reserva dos próprios agricultores. Dentro da metodologia utilizada por eles, as plantas eram colhidas pela manhã, no início do outono, durante a época de maior biodisponibilidade para aquelas sazonais. A secagem foi realizada ao ar, em varais à sombra, protegidos de insetos e chuva. O tempo de secagem, em média, foi de quinze dias. Toda a coleta das plantas ocorreu num raio de 1Km, a partir da referência 31°39'13"S, 53°03'39"O, localizada no município de Piratini, Rio Grande do Sul, e com altitude aproximada de 210 metros.

As plantas foram grosseiramente fraturadas e armazenadas em frascos de vidro, em ambiente escuro e fresco, até serem utilizadas. As amostras de plantas utilizadas neste estudo foram obtidas todas de uma só vez. Exsiccatas de cada uma das plantas foram produzidas [12], encaminhadas para identificação e conservação no herbário do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pelotas. As plantas utilizadas, e o seu número de referência, são apresentadas na Tabela 1.

Os extratos hidralcoólicos (EHA) e os decoctos (DEC) foram produzidos conforme descrito, com pequenas modificações [4]. Para produção do decocto, uma proporção de 1:10 (g/mL) de planta seca foi adicionada a água destilada estéril e colocada a ferver por dez minutos em fogo brando, em frasco Erlenmeyer estéril, coberto com uma placa de Petry. Após este período, o fluido produzido foi recuperado com pipeta, mensurado, reconstituído ao volume inicial com água destilada estéril e filtrado em gaze com quatro dobras. Cada decocto produzido foi submetido às avaliações realizadas neste trabalho em, no máximo, até 24 horas após a sua produção. Os EHAs foram produzidos na

**Tabela 1.** Taxonomia das plantas com indicativo medicinal submetidas à avaliação da ação antifúngica.

Espécie	Identificação
<i>Baccharis</i> grupo <i>trimera</i> (Less) DC (Compositae - Asteraceae)	Herbário Pel 24658
<i>Bidens pilosa</i> L. (Compositae - Asteraceae)	Herbário Pel 24657
<i>Eucalyptus</i> spp. Labill. (Myrtaceae)	Herbário Pel 24661
<i>Polygonum punctatum</i> L. (Polygonaceae)	Herbário Pel 24660
<i>Tagetes minuta</i> (Compositae - Asteraceae)	Herbário Pel 24659

mesma proporção que os decoctos – 1g de planta seca/ 10 mL de álcool de cereais, hidratado à densidade de 70<sup>o</sup>GL. A mistura foi colocada em frasco âmbar e agitada duas vezes por dia durante quinze dias. Ao final desse período, o seu volume original foi reconstituído com álcool de cereais a 70<sup>o</sup>C, filtrado em filtro de gaze com quatro dobras e armazenada em frasco âmbar, em local fresco e protegido da incidência direta da luz solar, até sua utilização. Para a realização dos testes de desinfecção, o solvente etanólico foi extraído utilizando evaporador rotativo a 40 rpm, com temperatura máxima para extração de 60<sup>o</sup>C e sob pressão negativa de 600 mm/Hg, em tempo o suficiente para extrair um mínimo de 95% do volume de álcool esperado. Após essa extração, o volume original era repostado com água destilada estéril, e a suspensão obtida era usada até, no máximo, 24 horas após a sua preparação.

Foram utilizadas seis amostras de dermatófitos, pertencentes a três espécies - *Microsporum canis* (ATCC 32903 e LM – Mc1, isolado de cão), *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 9533 e LM – Tm1, isolado de chinchila) e *Microsporum gypseum* (ATCC 14683 e LM – Mg, isolado do solo pela técnica da isca [9]). As amostras dos fungos foram mantidas em cultura em Agar Sabouraud adicionado de Cloranfenicol através de repiques bimestrais.

Para preparo do inóculo, os microrganismos foram ativados através do cultivo prévio em meio Mycosel<sup>1</sup>. Então, o micélio do fungo foi colhido com alça de platina, ressuspendido em salina estéril com Tween 80 à 1%, vigorosamente homogeneizado até alcançar a escala 2 de MacFarland, e diluído 50 vezes em caldo Sabouraud, preparado ao dobro da concentração indicada pelo fabricante.

O método utilizado para a realização dos antifungogramas foi a microdiluição em caldo modificado [13,14]. Brevemente, os extratos preparados foram diluídos em escala logarítmica de base 2, utilizando-se solução salina (NaCl a 0,8%) estéril, obtendo-se sete diluições a partir do extrato puro. O experimento foi realizado em microplacas de poliestireno com 96 orifícios, em que foram colocados em cada um 100 µL do inóculo e 100 µL de cada diluição do extrato, estabelecendo concentrações finais da suspensão a testar de 50 mL/100 mL a 0,782 mL/100 mL. Controles positivo de crescimento fúngico e negativo de esterilidade do extrato foram realizados. As microplacas foram fechadas e incubadas em estufa com agitação (25<sup>o</sup>C, 50 rpm)<sup>2</sup>, durante 10 dias.

A leitura foi realizada pelo método visual, onde a ausência de crescimento micelial visível indicou a eficácia da solução desinfetante, e o resultado foi expresso em Concentração Inibitória Mínima, indicada pela recíproca da diluição onde houve inativação completa do fungo, em g/L. Todos os testes foram realizados em duplicata.

A análise de variância e comparação entre médias geométricas dos CIMs das plantas, separadamente para cada forma de extração, e a comparação da sensibilidade das diferentes espécies de fungo aos vários extratos, foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis, considerando cada isolado fúngico como uma repetição. As diferenças entre DEC e EHA foram analisadas pelo teste pareado de Wilcoxon. Todas as análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico “Statistix 6.0”.

## RESULTADOS

A atividade antifúngica dos extratos de plantas, para cada amostra de dermatófito, avaliados neste trabalho está apresentada na Tabela 2. Os EHAs das plantas testadas apresentaram ação antifúngica frente às seis amostras testadas. O EHA de *T. minuta* e de *B. pilosa* foram significativamente melhores que os demais (p=0,0002), apresentando CIM médio de 10,5 e 13,2 mL/100 mL, respectivamente. Os demais EHAs apresentaram CIM ao redor de 30 mL/100 mL. Apenas os decoctos de *P. punctatum*, frente à amostra padrão de *M. canis*, e o DEC de *B. grupo trimera*, frente às duas amostras de *M. canis*, mostraram ação antifúngica. Para todas as plantas, a CIM do EHA foi significativamente mais baixa que o decocto (p < 0,05).

Quanto à sensibilidade das amostras testadas, não houve diferença significativa (P > 0,05). Apesar disso, as amostras de *T. mentagrophytes* apresentaram-se um pouco mais resistentes do que as demais.

## DISCUSSÃO

Utilizando por base a bibliografia etnofarmacológica brasileira, pesquisadores compuseram uma lista com 409 espécies de plantas brasileiras com potencial antifúngico. Entre essas, são citadas quatro plantas utilizadas neste trabalho, *B. trimera*, *Eucalyptus* spp., *B. pilosa* e “erva-de-bicho”, referida como *P. acre* [5].

Em um estudo na Índia, os autores obtiveram a inativação de dermatófitos de interesse em quinze a vinte segundos com óleo essencial de *Eucalyptus*, enquanto que, na concentração fungicida mínima, o tempo necessário

**Tabela 2.** Concentração Inibitória Mínima (CIM) médio das soluções desinfetantes obtidas a partir de extratos de plantas com indicativo etnográfico anti-séptico/desinfetante frente a diferentes isolados de dermatófitos.

Planta	Extrato	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	<i>T. mentag</i>	<i>T. mentag</i>	<i>M. gypseum</i>	<i>M. gypseum</i>	Média
		ATCC 32903	LM – MCI	ATCC 9533	LM – Tm1	ATCC 14683	LM – Mg1	
<i>B. grupo trimera</i>	DEC	50	50	>50	>50	>50	>50	79,4 <sup>B,a</sup>
	EHA	25	25	50	25	25	25	28,1 <sup>A,b</sup>
<i>B. pilosa</i>	DEC	>50	>50	>50	>50	>50	>50	100 <sup>B,a</sup>
	EHA	12,5	12,5	12,5	12,5	17,7	12,5	13,2 <sup>A,a</sup>
<i>Eucalyptus</i> spp.	DEC	>50	>50	>50	>50	>50	>50	100 <sup>B,a</sup>
	EHA	25	25	50	25	25	25	28,1 <sup>A,b</sup>
<i>P. punctatum</i>	DEC	50	>50	>50	>50	>50	>50	89,1 <sup>B,a</sup>
	EHA	50	25	25	50	25	25	31,5 <sup>A,b</sup>
<i>T. minuta</i>	DEC	>50	>50	>50	>50	>50	>50	100 <sup>B,a</sup>
	EHA	8,8	6,25	12,5	12,5	12,5	12,5	10,5 <sup>A,a</sup>
<b>Média</b>	DEC	75,8	87,1	100	100	100	100	--
	EHA	20,3	16,5	25	21,8	20,3	18,9	

\*A CIM está expressa pela média da concentração de extrato (mL/100 mL) realizada em duplicata. CIM negativo foi representado pelo valor >50 e, para cálculo da média, foi considerado com valor de 100.

\*\* EHA – Extrato hidralcoólico.

\*\*\*Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas entre extratos da mesma planta e, letras minúsculas, entre plantas no mesmo extrato (p < 0,05).

foi em torno de quatro a seis horas, dependendo da espécie de dermatófito avaliada. O mesmo grupo de pesquisa avaliou a eficácia de um fitofármaco produzido a partir desse óleo essencial, concluindo que ele é efetivo no tratamento de dermatofitose em humanos e não apresenta efeitos adversos [18,19]. Resultados semelhantes foram encontrados utilizando óleo de *Eucalyptus globulus* frente a *Malassezia furfur* [22]. Atividade antifúngica foi demonstrada a partir de extratos hexânicos, mas não de extrato metanólico, de *B. grisebachii* frente a dermatófitos [6].

Não se encontrou descrição na literatura de atividade antifúngica de extratos hidralcoólico para as plantas testadas neste trabalho, assim como nenhuma citação dessa atividade, mesmo a partir de outros extratos, de *T. minuta*. A utilização de etanol ou do decocto, para extração dos princípios ativos de plantas, apresenta-se mais próximo do acesso popular, já que apresentam maior facilidade no preparo e menor toxicidade à manipulação e ao uso dos extratos.

O tratamento antifúngico convencional apresenta dificuldades relacionadas à toxicidade, especialmente em pacientes imunodeprimidos, e ao desenvolvimento de resistência pelos microrganismos [1]. A fitoterapia pode

representar novos – tradicionais métodos de atuação frente a esta situação, inclusive em associação com antifúngicos sintéticos, já que extratos vegetais têm demonstrado efeito sinérgico a esses fármacos [20].

#### CONCLUSÃO

Os EHAs das plantas testadas (*B. grupo trimera*, *B. pilosa*, *Eucalyptus* spp., *P. punctatum* e *T. minuta*) apresentaram atividade antifúngica frente a dermatófitos de interesse na saúde animal e humana, e somente os decoctos de *P. punctatum* e *T. minuta* apresentaram atividade antifúngica.

Os resultados aqui demonstrados estimulam a utilização de EHA em medidas de controle de dermatofitose, como a inclusão desses extratos em sabonetes e outros produtos de higiene pessoal, para aspersão em animais, pura ou em associação a outros antifúngicos. Mais experimentos são necessários para avaliar a toxicidade e a efetividade *in vivo* desses extratos.

**Agradecimentos.** À CAPES, pelo fornecimento de bolsa ao primeiro autor, e a FIOCRUZ, pela gentil cedência das amostras padrões utilizadas neste trabalho.

#### NOTAS INFORMATIVAS

<sup>1</sup>BBL, EUA.

<sup>2</sup>Certomat, Alemanha.

REFERÊNCIAS

- 1 Araújo C.R.F., Pereira M.S.V., Higino J.S., Pereira J.V. & Martins A.B. 2005. Atividade antifúngica in vitro da casca de *Anacardium occidentale* LINN sobre leveduras do gênero *Candida*. *Arquivos de Odontologia*. 41: 263-270.
- 2 Del Palacio A., Garau M. & Cuétara M.S. 2002. Current treatment of dermatophytosis. *Revista Iberoamericana de Micologia*. 19: 68-71.
- 3 Eichenberg M.L., Berg V., Appelt C. E., Muschner A. C., Nobre M. O., Matta D., Hartz Alves S.H. & Ferreiro L. 2003. Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to azole antifungals agents evaluated by a new microdilution method. *Acta Scientiae Veterinariae* (Online). 31: 75-80.
- 4 Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil. 1959. 2.ed. São Paulo: Siqueira, 606p.
- 5 Fenner R., Betti A.H., Mentz L.A. & Rates S.M.K. 2006. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 42: 369-394.
- 6 Feresin G.E., Tapia A., López S.N. & Zacchino S.A. 2001. Antimicrobial activity of plants used in traditional medicine of San Juan province, Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*. 78: 103-107.
- 7 Gambale W., Larsson C.E., Moritami M.M., Correa B., Paula C.R. & Framil V.M.S. 1993. Dermatophytes and others fungi of the hair coat of cats without dermatophytosis in the city of São Paulo, Brazil. *Feline Practice-Fungi and Parasitology*. 21: 29-33.
- 8 Jungerman P.F. & Schwartzman R.M. 1972. *Veterinary Medical Mycology*. Philadelphia: Lea & Fabiger, pp. 3-28.
- 9 Lacaz C.S., Porto E., Heins-Vacari E.M. & Melo N.T. 1998. *Fungos, Actinomicetos e Algas de interesse médico*. São Paulo: Savier, 130 p.
- 10 Larsson C.E., Nahas C.R., Ledon A.L.B.P., Gambale W., Paula C.R. & Correa B. 1994. Ringworm in domestic cats in São Paulo, Brazil, between 1981-1990. *Feline Pratices-Dermatology*. 22: 11-14.
- 11 Lopes J.O., Alves S.H. & Benevenga J.P. 1994. Human dermatophytosis in Rio Grande do Sul (Brazil): 1988-1992. *Revista de Medicina Tropical*. 36: 115-119.
- 12 Ming L.C. 1995. Coleta de plantas medicinais. In: Di Stasi L.C. (Ed). *Plantas medicinais: arte e ciência*. São Paulo: UNESP, pp. 69-86.
- 13 Nascente P.S., Nobre M.O., Lucia Jr. T., Schuch L.F.D., Ferreiro L. & Meireles M.C.A. 2003. Evaluation of *Malassezia pachydermatis* antifungal susceptibility using two different methods. *Brazilian Journal Microbiology*. 34: 359-362.
- 14 National Committee for clinical Laboratory Standards - NCCLS. 1997. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts*. Approved Standard. M27 – A, v. 17, n. 9.
- 15 Nobre M.O., Meireles M.C.A. & Cordeiro J.M.C. 1999. Epidemia familiar por *Microsporium canis* transmitido por felino. In: Anais do XX Congresso Brasileiro de Microbiologia, (Salvador, Brasil). p. 317.
- 16 Romano C., Valenti L. & Barbara R. 1997. Dermatophytes isolated from asymptomatic stray cats. *Mycoses*. 40: 471-472.
- 17 Rycroft A.N. & Mclay C. 1991. Disinfectants in the control of small animal ringworm due to *Microsporium canis*. *Veterinary Record*. 129: 239-241.
- 18 Shahi S.K., Shukla A.C., Bajaj A.K., Banerjee U., Rimek D., Midgely G. & Dikshit A. 2000. Broad spectrum herbal therapy against superficial fungal infections. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*. 13: 60-64.
- 19 Shahi S.K., Shukla A.C., Bajaj A.K., Medgely G. & Dikshit A. 1999. Broad spectrum antimycotic drug for the control of fungal infection in human beings. *Current Science*. 76: 836-839.
- 20 Shin S. & Lim S. 2004. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. *Journal of Applied Microbiology*. 97: 1289-1296.
- 21 Silveira E.S., Nobre M.O. & Meireles M.C.A. 1999. *Trichophyton verrucosum* e *Trichophyton equinum* em pele hígida de bovinos e eqüinos. In: Anais do XIV Congresso Estadual de Medicina Veterinária (Gramado, Brasil). p. 219.
- 22 Vijayakumar R., Muthukumar C., Kumar T. & Saravanomuthu R. 2006. Characterization of *Malassezia furfur* and its control by using plant extracts. *Indian Journal of Dermatology*. 51: 145-148.