

ATIVIDADE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Bauhinia forficata* FRENTE AO *Sporothrix brasiliensis*

KARINA AFFELDT GUTERRES¹; CLAUDIA GIORDANI²; CAROLINE BOHNEN DE MATOS³; CRISTINE CIOATO DA SILVA⁴; MÁRIO MEIRELES⁵; MARLETE BRUM CLEFF⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – UFPel – guterres.karina@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – UFPel – claarte@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – UFPel – bohnenkarol@gmail.com

⁴Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS – criscioato@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – UFPel – meireles@ufpel.edu.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – UFPel – emebrum@bol.com.br

1. INTRODUÇÃO

Esporotricose é uma micose subcutânea grave que afeta humanos e animais (MONTEIRO et al., 2008), sendo considerada a principal micose subcutânea em felinos e caninos (SOUZA et al., 2009), podendo ser fatal (MARIMON et al., 2007). Durante muito tempo, apenas uma espécie era considerada patogênica dentro do gênero *Sporothrix*, identificada como *Sporothrix schenckii* (SOUZA et al., 2009). No entanto, recentemente, com base em estudos genômicos, sequenciamento de DNA, morfologia, fisiologia e nutrição, *S. schenckii* foi considerado um complexo que inclui seis espécies diferentes, havendo dentre estas, a espécie *S. brasiliensis*, encontrada no Brasil e considerada altamente patogênica (MARIMON et al., 2007). Nos últimos tempos, segundo Rodrigues e colaboradores (2013), o *Sporothrix brasiliensis* vem sendo diagnosticado no país em 96% dos casos de esporotricose felina e consequentemente humana devido a transmissão zoonótica existente.

O itraconazol é considerado o fármaco de primeira escolha para o tratamento das formas cutânea e linfocutânea de esporotricose, porém algumas espécies fúngicas tem demonstrado maior resistência a este antifúngico (SCHUBACH et al., 2004). Além disso, tem sido reportado a perpetuação da enfermidade, especialmente em felinos domésticos, principalmente devido ao longo tempo de tratamento e abandono da terapia, e as falhas terapêuticas por conta de resistência, o que traz grande preocupação à área médica (GIORDANI, 2013; LAVADOURO et al., 2013).

Neste contexto, tem se buscado novas alternativas ao tratamento convencional, destacando-se os estudos no âmbito das plantas medicinais, sob diversas formas de extrato (CLEFF, 2008). Dentre as plantas de interesse, destacam-se as da família Fabaceae, como a *Bauhinia forficata*, devido a atividade antibacteriana, cicatrizante, hipoglicemiante, antidiarreica, antiviral, analgésica, anti-tumoral e antifúngica que esta vem apresentando (MENEZES et al., 2007).

Dessa forma, o presente estudo objetivou avaliar a atividade antifúngica do extrato hidroalcoólico de *Bauhinia forficata* frente ao *Sporothrix brasiliensis*.

2. METODOLOGIA

A planta utilizada no estudo foi coletada no distrito do Povo Novo, Rio Grande - RS, sendo encaminhada para identificação no Setor de Botânica – UFPel e após seca em estufa com circulação de ar sob temperatura de 35°C.

Para o preparo do extrato vegetal foi utilizada a técnica descrita por SCHIEDECK et al. (2008), pesando-se 100g da planta e adicionando-se após 500mL de álcool de cereais 70%. Durante sete dias esta mistura permaneceu em frasco de vidro estéril hermeticamente fechado, protegido da luz e em temperatura ambiente, sendo agitada manualmente uma vez ao dia. Após este período, a amostra foi filtrada com gaze estéril, sendo o volume restituído com álcool de cereais 70%, resultando em uma tintura, que permaneceu em frasco âmbar estéril hermeticamente fechado até o uso. No momento do uso do extrato, foi utilizado o rotaevaporador à vácuo com banho de aquecimento a 40°C para retirada do álcool de cereais 70% (solvente), restituindo-se com H₂O destilada estéril, resultando em um extrato hidroalcoólico. O extrato foi testado em dez concentrações seriadas de 100 a 0,19mg/mL em duplicata. O antifúngico itraconazol foi testado também como método comparativo e de identificação de resistência dos isolados.

Foram utilizados seis isolados de *S. brasiliensis* provenientes de casos clínicos de felinos e um de canino, em sua forma filamentosa através do cultivo em meio Sabouraud Dextrose com Cloranfenicol a 25°, estocados no Laboratório de Micologia Veterinária - UFPel. O método utilizado para avaliação da atividade antifúngica foi microdiluição em caldo com base no documento M38-A2 (2008) do CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute com modificações para fitofármacos e *S. brasiliensis*. O inóculo foi preparado a partir de colônias fúngicas com sete dias de crescimento, onde adicionou-se 2mL de solução salina nas placas contendo as colônias, homogeneizando-se e transferindo-se após o conteúdo a um tubo de ensaio. A partir deste, colocava-se 2mL em um tubo contendo 4mL de solução salina estéril, padronizando-se com espectrofotômetro (comprimento de onda de 530nm e transmitância de 70-76%). Foram realizadas duas diluições seriadas, na primeira diluição o inóculo foi padronizado com solução fisiológica estéril (1:100) e a segunda diluição foi feita com o meio RPMI - 1640 na concentração de 1:20, a partir da primeira diluição. Os resultados foram expressos em Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM), por leituras visuais do crescimento das colônias ou turvação do meio. Para determinação da CFM, foram semeados 10µL das suspensões das microplacas em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol incubadas a 25°C por sete dias.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identificação botânica resultou na planta *Bauhinia forficata*, com número de registro 25933, no setor de Botânica da UFPel.

No teste *in vitro*, utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo, não foi evidenciada atividade satisfatória do extrato hidroalcoólico de *Bauhinia forficata* frente aos isolados de *Sporothrix brasiliensis*, na maior concentração testada (100mg/ml) (Tabela 1). Em relação ao antifúngico itraconazol, este apresentou CFM em cinco isolados, na concentração de 64 µg/ml (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados do teste de microdiluição em caldo avaliando a atividade do extrato hidroalcoólico de *Bauhinia forficata* e o antifúngico padrão itraconazol frente a isolados de *Sporothrix brasiliensis*.

Isolado	Extrato (mg/ml)		Antifúngico padrão ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	<i>Bauhinia forficata</i>		Itraconazol	
	CIM	CFM	CIM	CFM
1	100	>100	64	64
2	100	>100	8	>64
3	100	>100	>64	>64
4	100	>100	0,5	64
5	100	>100	64	64
6	100	>100	16	64
7	100	>100	16	64

*Valores de >100 correspondem a concentração sem atividade inibitória/fungicida.

O complexo *Sporothrix* vem sendo estudado quanto a diferenças de patogenicidade e sensibilidade (OLIVEIRA et al. 2011), sendo que algumas espécies tem demonstrado maior resistência ao itraconazol, antifúngico de escolha para o seu tratamento, pertencente ao grupo dos azóis (SCHUBACH et al., 2004). Devido a esta realidade torna-se essencial a pesquisa por novas alternativas para o tratamento da esporotricose, destacando-se o uso das plantas medicinais, como a *Bauhinia forficata*.

O potencial antimicrobiano de *Bauhinia forficata* já vem sendo estudado, tendo apresentado atividade na forma de acetato de etila dos caules frente a *Epidermophyton floccosum*, com CIM de 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$, assim como os extratos de hexano das cascas, o qual foi ativo frente *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* e *E. floccosum* com CIM<1000mg/ml para todas as espécies fúngicas estudadas (SILVA & FILHO, 2002). O extrato de diclorometano das cascas apresentou o melhor resultado antifúngico, sendo ativo contra *T. rubrum* e *E. floccosum* com CIM de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (SILVA & FILHO, 2002).

A atividade antibacteriana de *Bauhinia forficata* foi também avaliada, por Souza e colaboradores (2000), que utilizaram extratos e frações de *B. forficata* através do método de difusão radial em ágar, observando inibição do crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* na concentração de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Apesar de a planta *Bauhinia forficata* apresentar atividade frente a microorganismos variados, não há estudos da sua atividade frente ao complexo *Sporothrix*, mais especificamente frente ao *S. brasiliensis*, em nenhuma forma de extrato ou parte da planta. Tratando-se do complexo *Sporothrix*, RATSLAFF (2013) estudou a utilização das plantas *Schinus terebinthifolius*, *Baccharis trimera* e *Solidago chilensis*, em testes de microdiluição em caldo, nos quais se obteve resultados satisfatórios, sendo a maior CFM de *Schinus terebinthifolius* de 25mg/mL, nos isolados testados. Já D'AVILA (2013), com a utilização da família Lamiaceae na forma de óleos essenciais em testes *in vitro* frente ao *S. schenckii*, sendo que a planta *Rosmarinus officinalis*, pertencente à família apresentou CFM de $\leq 0,06$ mg/mL nos isolados testados.

Os resultados obtidos no teste *in vitro* utilizando o antifúngico padrão itraconazol evidenciaram maior resistência dos isolados testados quando comparado a outros testes realizados em outros experimentos, sendo os valores de CIM variando entre 0,5 a >64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e os de CFM $\geq 64\mu\text{g}/\text{mL}$. D'AVILA (2013) cita a variação da CFM de itraconazol em seus testes de 4 a >16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e a variação de CIM de 0.25 a >16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, valores consideravelmente inferiores aos encontrados no presente experimento.

Observa-se, então, que o extrato de *Bauhinia forficata* na forma de extrato hidroalcoólico não apresentou o efeito desejado nas concentrações testadas, o

que pode ser decorrente do tipo de extrato, parte vegetal, concentrações testadas e até mesmo da resistência dos isolados testados (SILVA et al., 2009).

4. CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que o extrato hidroalcoólico de *Bauhinia forficata* não apresentou atividade antifúngica *in vitro* nas concentrações testadas, com valores de CIM de 100 mg/mL e CFM superior a 100 mg/mL. Maiores estudos acerca da atividade da planta, utilizando outras formas de extratos, concentrações e outras partes vegetais devem ser realizados, visto que esta apresenta atividade frente a outros fungos, podendo vir a ser uma alternativa ao tratamento convencional da esporotricose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CLEFF, MARLETE BRUM. Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. frente a fungos de importância em veterinária com ênfase em *Candida* spp. 2008. 129f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: proposed standard. M38-A2, 2008.
- D'AVILA, C. A.; WALLER, S. B.; MADRID, I. M.; MELLO, J. R. B.; FARIAS, R. O.; MEIRELES, M. C. A. Atividade *in vitro* de *Rosmarinus officinalis* frente a cepas do complexo *Sporothrix* sp. XXII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas, 2013.
- GIORDANI, C. Investigação de plantas medicinais e tóxicas em Pelotas-RS e determinação da atividade antifúngica frente a *Malassezia pachydermatis*. 2013. 26f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária)- Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.
- LAVADOURO, J. B.; MATOS, C. B.; LOPES, D. J.; BATISTA, M. S.; AÑAÑA, D. C., CAPELLA, G. A.; CLEFF, M. B. Dificuldades terapêuticas no tratamento da esporotricose felina. 12ª Mostra de Produção Universitária. Rio Grande – RS, Brasil, 23 a 25 de outubro de 2013.
- MARIMON R, CANO J, GENE´ J, SUTTON DA, GUARRO J, KAWASAKI M. *Sporothrix brasiliensis* S. *globosa* and *S. mexicana* Three New *Sporothrix* species of clinical interest. J Clin Microbiol. 2007;45:3198–206.
- MENEZES, F.S.; MINTO, A.B.M.; RUELA, H.S.; KUSTER, R.M.; SHERIDAN,H.; FRANKISH, N., 2007. Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. Rev. Bras. Farmacogn. 17: 8-13.
- MONTEIRO HRB, TANENO JC, NEVESMF. Esporotricose em felinos domésticos. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária Ano VI, Número 10, Janeiro de 2008. Periódico Semestral.
- OLIVEIRA, D. C.; LOPES, P. G. M.; SPADER, T. B.; MAHL, C. D.; ALVES, G. R. T.; LARA, V. M.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. Antifungal Susceptibilities of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis*, and *S. luriei* of the *S. schenckii* Complex Identified in Brazil. Journal of Clinical Microbiology, Aug. 2011, p. 3047–3049, Vol. 49, No. 8.
- RATSLAFF, K. ; GIORDANI, C.; ALVES, G. A.; SANTIN, R.; MADRID, I. M.; CLEFF, M. B. Ação dos extratos hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius*, *Baccharis trimera* e *Solidago chilensis* em *Sporothrix schenckii*. XXII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas, 2013.
- RODRIGUES, A. M., TEIXEIRA, M. M., HOOG, G. S., SCHUBACH, T. M. P., PEREIRA, S. A., FERNANDES, G. F., BEZERRA, L. M. L., FELIPE, M. S., CAMARGO, Z. P. Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline Sporotrichosis Outbreaks. PLoS Negl Trop Dis. 20;7 (6): 2281, 2013.
- SCHIEDECK, G.; BEVILAQUA, G.A.P.; NACHTIGAL, G.F.; BAUER, M.V.L. Método de preparo de tintura de plantas bioativas para fins agrícolas. Comunicado técnico-EMBRAPA, Pelotas, n.190, p.1-4, 2008.
- SCHUBACH, T. M., SCHUBACH, A. O, OKAMOTO, T., FIGUEIREDO, F. B., PEREIRA, S.A., LEME, L.R.P., SANTOS, I.B., REIS, R.S., PAES, R.A., PEREZ, M.A., MARZOCHI, M.C.A., FRANCESCONI-DO-VALLE, WANKE, B. Utilidade do coágulo sanguíneo para o isolamento de *Sporothrix schenckii* de gatos naturalmente infectados. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v.41, p.404-408, 2004.
- SILVA, A. C. Efeito *in vitro* de compostos de plantas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz: isolado do maracujazeiro. Ciências e Agrotecnologia, Lavras, v. 33, n.spe, p.1853-1860, 2009.
- SILVA, K. L.; FILHO, V. C. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. Quim. Nova, Vol. 25, No. 3, 449-454, 2002.
- SOUZA, N. T., NASCIMENTO, A. C. B. M., SOUZA, J.O.T., SANTOS, F.C.G.C.A., CASTRO, R.B. Esporotricose canina: relato de Caso. ArqBrasMedVet Zoo. 2009;61:572–6.
- SOUZA, R. S. S.; SANTOS, D. R.; BELLA CRUZ, R. C.; VI Seminário Integrado de Iniciação Científica, Camboriú, Brasil, 2000.