



ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS NATURAIS OBTIDOS POR TECNOLOGIA SUPERCRÍTICA

*Caroline Ortega Terra Lemos*¹, *Vitor Augusto dos Santos Garcia*², *Elisangela Mendes dos Santos*³, *Lílian Cristiane Baeza*⁴, *Vladimir Ferreira Cabral*⁵

RESUMO: *Piper regnellii* var. *pallescens* (Pariparoba) é uma planta medicinal que ocorre no Brasil e seu óleo é popularmente utilizado para tratar ulcerações e irritação da pele. Esta espécie é composta por várias substâncias bioativas, em geral neolignanais, que são responsáveis por apresentar atividade antimicrobiana. As dermatofitoses são processos infecciosos de pele, pêlo e unhas muito comuns no mundo inteiro. O caráter crônico das lesões e a dificuldade de absorção das drogas disponíveis aliados ao elevado custo dos antifúngicos clássicos, são condições limitantes para o sucesso terapêutico das dermatofitoses. Neste contexto, avaliou-se a capacidade antifúngica contra as cepas de *T. rubrum* ATCC 28189 e *T. mentagrophytes* ATCC 11481, pelos diferentes extratos supercríticos obtidos das folhas e dos caules de Pariparoba. A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada de acordo com o documento M38-A2 (2008) do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). O material botânico foi seco em estufa, triturado e separado para obter granulometria em torno de 0,3 mm. A extração supercrítica usando CO₂ como solvente ocorreu nas temperaturas de 40 e 60°C e em pressões que variaram de 109,2 à 250 bar. A faixa de concentração avaliada foi de 0,97 a 500 µg/mL. Todos os extratos testados demonstraram forte atividade antifúngica com CIM entre 3,9 e 15,5 µg/mL para ambos os fungos. A extração com fluido supercrítico é seletiva e um método ambientalmente correto para a extração de produtos naturais. Sendo assim conclui-se que a Pariparoba tem potente ação antifúngica podendo ser explorada no tratamento das dermatofitoses.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade antifúngica, dermatófitos, *Piper regnellii*.

1 INTRODUÇÃO

A família Piperaceae, da qual pertence à *Piper regnellii* é pantropical, com espécies distribuídas pelas Américas, do México até o Sudoeste da Argentina (Figueiredo *et al.*, 2000). Nesta família encontram-se plantas de porte arbustivo, herbáceo ou árvores de mais de 3 m de altura. Cerca de 700 espécies pertencentes ao gênero *Piper* estão distribuídas nos dois hemisférios, tanto em regiões tropicais como em subtropicais (Parmar *et al.*, 1997).

¹ Acadêmica do curso de mestrado em Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Maringá – Paraná. Bolsista CAPES. carolaterra@hotmail.com

² Acadêmico do curso de mestrado em Agronomia da Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Maringá – Paraná. Bolsista CAPES. garcia.vitoraugusto@gmail.com

³ Acadêmica do curso de doutorado em Agronomia da Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Maringá – Paraná. Bolsista CAPES. elisbio3@yahoo.com.br

⁴ Professora doutora da Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Maringá – Paraná. lilianbaeza@gmail.com

⁵ Orientador professor doutor da Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Maringá – Paraná. vladimir@deq.uem.br

O gênero *Piper* inclui um grande número de espécies muito utilizadas no tratamento de diversas doenças, cuja importância econômica e comercial se deve à produção de óleos essenciais de interesse na indústria farmacêutica e de inseticida (Corrêa, 1984).

Dentre as espécies empregadas para fins terapêuticos, destaca-se a *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck., conhecida popularmente por pariparoba, caapeba e capeba. Na medicina popular, suas raízes são utilizadas no tratamento das obstruções do fígado e do baço, para cicatrização de feridas, redução de inchaços, irritações na pele e também por apresentar atividade analgésica.

Substâncias isoladas de diferentes espécies de *Piper* têm incitado interesse, dos pesquisadores, devido às atividades biológicas. Pesquisas de Benevides *et al.* (1999) isolaram diferentes neolignan presentes no extrato em acetato de etila das raízes de *P. regnellii* (Miq.) C. DC., dentre as quais o conocarpano, eupomatenóide-3, eupomatenóide-5 e eupomatenóide-6. Estes compostos são conhecidos por possuírem boa atividade microbiológica.

As dermatofitoses são infecções cutâneas causadas por fungos queratinofílicos denominados dermatófitos, que compreendem os gêneros *Microsporum*, *Epidermophyton* e *Trichophyton*, semelhantes em sua morfofisiologia, imunologia e taxonomia. As dermatofitoses apresentam-se como as infecções fúngicas mais comuns em países tropicais, constituindo um problema de saúde pública e refletindo baixo nível de educação sanitária. A distribuição e frequência das dermatofitoses e seus agentes etiológicos variam segundo a região geográfica e o nível sócio econômico da população (Boncompagni *et al.*, 1997).

Assim, este trabalho objetivou avaliar a capacidade antifúngica *in vitro* dos diferentes extratos de *Piper regnellii* obtidos sob diferentes condições de extração supercrítica.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Pré-tratamento da planta

As folhas e os caules de *Piper regnellii* foram coletados de espécimes do “Horto Didático de Plantas Medicinais Prof^a Irenice Silva” no campus da Universidade Estadual de Maringá em Setembro de 2010.

O material botânico foi seco em estufa de ar circulante a temperatura de 40 °C. Após 72 horas de secagem separaram-se as folhas dos caules para a moagem em moinho de facas. Peneiras do tipo Tyler foram utilizadas para a classificação das amostras, segundo sua granulometria. As folhas e caules selecionados tinham tamanho médio de 0,3 mm.

Obtenção dos extratos

Os experimentos supercríticos foram realizados em uma unidade de escala laboratorial, que consiste basicamente de um cilindro de CO₂, dois banhos termostatizados, uma bomba seringa (ISCO, Modelo 500D) e um extrator com volume interno de aproximadamente 170 mL (diâmetro do leito é de 2,85 cm e altura do leito é 26,1 cm).

Os principais parâmetros que influenciam no rendimento de óleos obtidos via extração supercrítica são: pressão, temperatura e vazão de solvente, além do tamanho médio das partículas. Sendo assim, utilizaram-se 3 combinações destes parâmetros para as extrações, apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros de extração utilizados na extração supercrítica.

Corrida	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Densidade (g/cm ³)	Vazão (mL/min)
1	109,2	40	0,68125	3
2	244,1	60	0,78112	3
3	250,0	40	0,88022	3

Realizaram-se, separadamente, extrações com 20 g das folhas e 30 g dos caules em tempo de 280 e 260 minutos, respectivamente.

Microrganismos usados e condições de crescimento

Para os extratos analisados, foram determinadas as Concentrações Inibitória Mínima (CIMs), determinadas pela metodologia de microdiluição em caldo, segundo o documento M38-A2 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011). Como droga padrão, usou-se Terbinafina (Novartis).

Os extratos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO - Amresco, Sólton, OH, USA) para uma concentração de 20 mg/mL. Seguido de diluição com água destilada estéril para uma concentração de 500 µg/mL. As concentrações testadas dos extratos vegetais foram 0,98 a 500 µg/mL.

Foram testados os microrganismos *T. rubrum* ATCC 28189 e *T. mentagrophytes* ATCC 11481. Para o preparo do inóculo, os fungos foram suspensos em solução salina e a quantificação foi feita pela contagem em câmara de Neubauer. Posteriormente, essas suspensões foram diluídas em meio RPMI acrescido de 2% de glicose, para obtenção de 2×10^3 até 6×10^3 UFC/mL.

O teste foi realizado em microplacas de 96 poços (Nunclon, Delta, Nunc A/S, Roskilde, Denmark®), onde as suspensões com fungos foram testadas com os extratos em questão, e incubadas a 35 °C por 4 à 7 dias.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das CIMs dos extratos brutos testados contra os fungos *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* pela técnica de microdiluição em caldo são apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Resultados dos CIMs dos testes *in vitro* em fungos filamentosos utilizando os extratos obtidos.

Extratos	CIM (µg/mL)			
	<i>T. rubrum</i>		<i>T. mentagrophytes</i>	
	Folhas	Caules	Folhas	Caules
ESC (P=109,2 bar/40 °C)	15,5	15,5	15,5	15,5
ESC (P=244,1 bar/60 °C)	7,8	7,8	7,8	7,8
ESC (P=250,0 bar/40 °C)	7,8	7,8	3,9	7,8

Nos extratos das folhas de *Piper regnellii*, com o aumento da pressão e, conseqüentemente da densidade, há também uma diminuição nos valores de CIM. Isso nos sugere que um maior poder solvente é necessário para uma maior atividade antifúngica.

Podemos observar também que não há diferença considerável no poder antifúngico apresentado por folhas e caules. Uma vez que essa variação é de 1 poço ou menos. Segundo Felipe (2006) as folhas e os caules de espécie não apresentam diferença

significativa com relação ao teor de conocarpano (substância responsável pela boa atividade antifúngica).

Koroishi *et al.* (2008) constataram que o extrato hidroalcoólico de *Piper regnellii* apresentou uma forte atividade contra os fungos dermatófitos *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum* com CIMs de 15.62, 15.62, 15.62 e 62.5 µg/mL, respectivamente. Os compostos isolados eupomatenóide-3 e eupomatenóide-5 apresentaram forte atividade contra *Trichophyton rubrum* com CIM de 6.2 à 50 µg/mL, respectivamente.

4 CONCLUSÃO

A purificação de uma determinada substância está relacionada com muito empenho, baixo rendimento e resíduo de solventes. Já com a extração supercrítica obtemos um material livre de qualquer contaminação, inclusive microbiológica. Sendo assim, ainda que a substância isolada apresente um melhor valor de CIM se faz necessário pensar em custo-benefício.

REFERÊNCIAS

BENEVIDES, P. J. C.; SARTORELLI, P.; KATO, M. J. Phenilpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. **Phytochemistry**, 52, p. 339-343, 1999.

BONCOMPTE, E.; ALGUERÓ, M.; VIDELA, S.; FORN, J. Contribution al estudio de las dermatomicosis en Cataluña. **Revista Iberoamericana Micologia**, 14, p.26-28, 1997.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S21. CLSI, Wayne, PA, 165 pp, 2011.

CORRÊA M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas, Empresa Nacional, 1984.

FIGUEIREDO, R. A.; SAZIMA, M. Pollination biology of Piperaceae species in southeastern Brazil. **Annals Botany Company**, 85: 455-460, 2000.

PARMAR V. S.; JAIN S. C.; BISHT K. S.; JAIN R.; TANEJA P.; JHA A.; TYAGI O. D.; PRASAD A. K.; WENGEL J.; OLSEN C. E.; BOLL P. M. Phytochemistry of the genus *Piper*, **Phytochemistry**, 46, p. 597-673, 1997.