

## EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA IN VITRO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ageratum conyzoides* L.

Bárbara Maria Nunes<sup>1</sup>; Karina Perrelli Randau<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Farmácia – CCS – UFPE; E-mail: barbamnunes91@gmail.com

<sup>2</sup>Docente/pesquisador do Depto de Farmácia – CCS – UFPE. E-mail: krandau@hotmail.com

**Sumário:** *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae), conhecida popularmente como mentrasto, é uma espécie utilizada por comunidades no estado de Pernambuco na atenção básica à saúde devido ao seu potencial terapêutico no tratamento de diversas enfermidades, como purgante, febrífugo, no tratamento de úlceras, como anti-inflamatório, analgésico e anestésico. Levando em consideração a importância do óleo essencial de *A. conyzoides* para o desenvolvimento de novos produtos naturais, o objetivo desse trabalho foi extrair, caracterizar e desenvolver uma metodologia analítica para quantificação dos constituintes do óleo essencial das folhas de *A. conyzoides*, além de avaliar sua atividade antifúngica *in vitro* frente espécies de *Candida*. O óleo essencial foi extraído das folhas frescas da planta pelo método de hidrodestilação, utilizando aparelho de Clevenger modificado e, posteriormente, analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (CG-DIC). A atividade antifúngica foi realizada através de teste quantitativo pelo método de microdiluição em placas e a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada em placas de microdiluição com 96 poços. O rendimento do óleo essencial foi de 0,16% (v/p). Na análise em CG-EM foram observados os sesquiterpenos precoceno I (84,16%) e o  $\beta$ -cariofileno (6,55%) como constituintes majoritários. Considerando a análise qualitativa do método desenvolvido para a análise do óleo essencial, pode-se constatar a presença de 10 picos, com tempos de retenção entre 3,0 e 43,1 minutos, com tempo de análise de 73,6 minutos. O óleo essencial das folhas de *Ageratum conyzoides* em ensaio qualitativo inibiu o crescimento de oito das vinte cepas de *Candida* testadas e teve menor CIM frente às cepas dos isolados clínicos 451 – *Candida parapsilosis*, 14206 – *Candida krusei*, 3586 – *Candida glabrata* e 7755 – *Candida parapsilosis*. A espécie pode ser considerada um material vegetal com potencial para a elaboração de novos antifúngicos tópicos contra candidíase, que é uma das principais infecções por fungos e que apresentam índices de resistência preocupantes para as classes médica e científica.

**Palavras-chave:** *Ageratum conyzoides*; antifúngico; *Candida*; óleo essencial

### INTRODUÇÃO

Entre as 71 espécies vegetais presentes na RENISUS, encontra-se *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae), conhecida popularmente como mentrasto e que apresenta uso medicinal difundido no Brasil e em outros países. A planta é utilizada por comunidades no estado de Pernambuco na atenção básica à saúde devido ao seu potencial terapêutico no tratamento de diversas enfermidades, como purgante, febrífugo, no tratamento de úlceras, como anti-inflamatório, analgésico e anestésico (OLIVEIRA et al., 2010). A espécie apresenta diversos metabolitos secundários, muitos biologicamente ativos, incluindo flavonoides, alcaloides, cumarinas, óleos essenciais e taninos (BOSI et al., 2013). O óleo essencial de *Ageratum conyzoides* tem atividade antimicrobiana frente a bactérias, fungos e protozoários (NOGUEIRA et al., 2010; MELO et al., 2011). O uso indiscriminado de antibióticos pela população trouxe um dos grandes problemas enfrentados hoje pela classe

médica e científica, a resistência bacteriana. Da mesma forma, tem-se observado resistência aos antifúngicos por cepas de *Candida albicans* e demais espécies e, nas últimas décadas, observa-se um aumento na incidência de infecções fúngicas (FREIRES et al., 2014; NAEINI; NADERI; SHOKRI, 2014). Visto que a maioria dos antifúngicos clinicamente utilizados tem vários inconvenientes em termos de toxicidade, baixa eficácia e custo e por existir uma grande demanda por novos antifúngicos de diferentes classes estruturais, a comunidade científica tem se dedicado à busca de novos agentes terapêuticos, utilizando as plantas medicinais e/ou seus derivados como fonte de pesquisa por novas biomoléculas de interesse (MENEZES et al., 2009). Levando em consideração a importância do óleo essencial de *A. conyzoides* para o desenvolvimento de novos produtos naturais, o objetivo desse projeto foi extrair, caracterizar e desenvolver uma metodologia analítica para quantificação dos constituintes do óleo essencial das folhas de *A. conyzoides*, além de avaliar sua atividade antifúngica *in vitro* frente espécies de *Candida*.

### MATERIAIS E MÉTODOS

A espécie vegetal foi coletada no município de Camocim de São Félix – PE. Uma exsiccata foi encaminhada ao Herbário Dárdano de Andrade Lima, onde recebeu o número de tombamento 89312. O óleo essencial foi extraído das folhas frescas de *Ageratum conyzoides* pelo método de hidrodestilação, utilizando aparelho de Clevenger modificado. O rendimento do óleo essencial foi calculado e expresso em mililitros de óleo essencial por 100 gramas de droga (BRASIL, 2010). A amostra do óleo essencial de *A. conyzoides* foi preparada mediante diluição de 10 µL do óleo em 300 mL de acetona, sendo injetado 1 µL dessa diluição em um cromatógrafo à gás-líquido acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM), Shimadzu (GCMS-QP2010S). Foi utilizada uma coluna capilar de sílica (RTX-5; 30 m x 0,25 mm x 1 µm). A caracterização dos constituintes do óleo foi baseada no índice de retenção linear (Índice de Kovats) e nos respectivos espectros de massa, por comparação com espectros de massas registrados em bases de dados de referência. Para quantificação dos constituintes a amostra do óleo essencial das folhas de *A. conyzoides* (100 µL) foi diluída em hexano (900 µL) para injeção no cromatógrafo. O padrão utilizado foi o trans-cariofileno. O método foi estabelecido através de análises realizadas em um cromatógrafo a gás (GC-17A, Shimadzu), equipado com detector de ionização em chama, injetor tipo split com divisão de vazão de 1:100 e utilizando uma coluna capilar SPBTM-5 (Supelco) (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm). As temperaturas do injetor e do detector foram de 250 °C e 260 °C, respectivamente, e a programação da temperatura do forno foi: 50 °C - 100 °C (2,5 °C/min); 100 °C - 200 °C (2,0 °C/min); 200 °C - 250 °C (30,0 °C/min); 250 °C (2 min). Hélio foi utilizado como gás de arraste na vazão de 1,50 mL/min. O volume de injeção foi de 1 µL. Foram utilizadas culturas de *Candida famata*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis* e *Candida albicans*, provenientes do Laboratório de Micologia Médica e da Micoteca URM, Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. Para a atividade antifúngica *in vitro*, o óleo essencial de *A. conyzoides* foi diluído em Dimetilsulfóxido (DMSO) para realização do teste quantitativo pelo método de microdiluição em placas. A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada em placas de microdiluição com 96 poços (ALAMAR®, Diadema, São Paulo, Brasil), dispostos em 12 colunas (1 a 12) e 8 linhas (A a H). Nas colunas foram dispostas as concentrações e em cada linha uma cepa de *Candida* estudada. No primeiro poço continha: 100 µL do óleo diluído em DMSO (1:1) + 100 µL do meio RPMI + 100 µL do inóculo, obtendo concentração inicial de 142.500 µg/mL. As concentrações subsequentes dos óleos essenciais foram obtidas após diluição seriada na placa de microdiluição,

partindo-se da concentração inicial de 142.500 µg/mL (coluna 1) até 278,32 µg/mL (coluna 10), mostradas na tabela 2. O padrão negativo continha meio de cultura RPMI e óleo essencial e o padrão positivo meio RPMI e cepas de *Candida*.

### RESULTADOS

O rendimento do óleo essencial foi de 0,16% (v/p). Na análise em CG-EM foram observados os sesquiterpenos precoceno I (84,16%) e o β-cariofileno (6,55%) como constituintes majoritários. Considerando a análise qualitativa do método desenvolvido para a análise do óleo essencial, pode-se constatar a presença de 10 picos, com tempos de retenção entre 3,0 e 43,1 minutos, com tempo de análise de 73,6 minutos. O óleo essencial das folhas de *Ageratum conyzoides* em ensaio qualitativo inibiu o crescimento de oito das vinte cepas de *Candida* testadas. Os valores da CIM do óleo essencial das folhas de *A. conyzoides* sobre as cepas de *Candida* são apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de *Ageratum conyzoides*

Inóculo	CIM – 48h	CIM – 48h	CIM – 48h
	Padrão Anfotericina B (µg/mL)	Padrão Fluconazol (µg/mL)	(mg/mL)
130292 – <i>Candida albicans</i>	1	0,5	4,45
633 – <i>Candida guilliermondii</i>	1	0,25	4,45
9584 - <i>Candida tropicalis</i>	1	2	4,45
5623 - <i>Candida famata</i>	0,5	1	4,45
451 - <i>Candida parapsilosis</i>	1	0,25	2,22
14206 - <i>Candida krusei</i>	1	R*	2,22
3586 – <i>Candida glabrata</i>	2**	1	2,22
7755 – <i>Candida parapsilosis</i>	0,5	0,25	2,22

Anfotericina B: 16 – 0,03 µg/mL; Sensível: ≤ 1 µg/mL; Resistência: ≥ 2 µg/mL. Fluconazol: 64 – 0,125 µg/mL; Sensível: ≤ 2 µg/mL; Resistente: ≥ 8 µg/mL; R\*: resistente.

### DISCUSSÃO

Estudo de Patil e colaboradores (2010) alcançaram um rendimento próximo de 0,18% (v/p). No entanto, outros autores, como Rana e Blazquez (2003) e Vieira et al. (2012) apresentaram rendimentos de 0,24% (p/p) e 0,46% (p/p), respectivamente. O precoceno I (84,16%) e o β-cariofileno (6,55%) são constituintes majoritários. Patil e colaboradores (2010) indicam estes mesmos constituintes, porém, com concentrações diferentes, sendo precoceno I (52,18%) e β-cariofileno (26,22%). Essa diferença nos teores dos componentes químicos do óleo essencial de *A. conyzoides* pode ser resultado do uso de um diferente método de extração, além da variação do local de coleta. A espécie de *C. krusei* (14206) mostrou-se resistente ao Fluconazol e teve inibição pelo óleo essencial de *A. conyzoides* na concentração de 2,22 mg/mL. Já a espécie *C. glabrata* (3586) se mostrou resistente à Anfotericina B e também foi inibida pelo óleo essencial de *A. conyzoides* na concentração de 2,22 mg/mL (Tabela 2). Sabe-se que a espécie *C. krusei* tem resistência intrínseca ao Fluconazol, ao passo que outras espécies, como *C. tropicalis* e *C. glabrata* têm apresentado crescente resistência adquirida.

### CONCLUSÕES

O óleo essencial das folhas de *Ageratum conyzoides* apresentou um rendimento moderado comparado com estudos anteriores. Os constituintes majoritários encontrados, os já citados na literatura, precocenos I e II e  $\beta$ -cariofileno, variaram apenas em concentração, com relação a dados da literatura. O óleo essencial demonstrou ainda atividade antifúngica frente às diferentes espécies de *Candida*, com concentrações inibitórias mínimas que vão de 2,22 mg/mL a 4,4 mg/mL. A espécie pode ser considerada um material vegetal com potencial para a elaboração de novos antifúngicos tópicos contra candidíase, que é uma das principais infecções por fungos e que apresentam índices de resistência preocupantes para as classes médica e científica.

### AGRADECIMENTOS

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC/CNPq, à professora orientadora Dra. Karina Perrelli Randau e à Doutoranda Rafaela Damasceno Sá.

### REFERÊNCIAS

- Bosi, C. F. et al. 2013. Pyrrolizidine alkaloids in medicinal tea of *Ageratum conyzoides*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 23: 425-432.
- Brasil. 2010. *Farmacopeia Brasileira*. 5. ed. Fiocruz. Rio de Janeiro.
- Freires, I. A. et al. 2014. *Coriandrum sativum* L. (Coriander) essential oil: antifungal activity and mode of action on *Candida* spp. and molecular targets affected in human whole-genome expression. *Plos One* 9: 1-13.
- Melo, N. I. et al. 2011. Schistosomicidal activity of the essential oil of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) against adult *Schistosoma mansoni* worms. *Molecules* 16: 762-773.
- Menezes, T. O. A. et al. 2009. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. *Revista de Odontologia da UNESP* 38: 184-191.
- Naeni, A., Naderi, N. J. & Shokri, H. 2014. Analysis and in vitro anti-*Candida* antifungal activity of *Cuminum cyminum* and *Salvadora persica* herbs extracts against pathogenic *Candida* strains. *Journal de Mycologie Médicale* 24: 13-18.
- Nogueira, J. H. C. et al. 2010. *Ageratum conyzoides* essential oil as aflatoxin suppressor of *Aspergillus flavus*. *International Journal of Food Microbiology* 137: 55-60.
- Oliveira, G. L. et al. 2010. Plantas medicinais utilizadas na comunidade urbana de Muribeca, Nordeste do Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 24: 571-577.
- Patil, R. P. et al. 2010. Antiaflatoxigenic and antioxidant activity of an essential oil from *Ageratum conyzoides* L. *J Sci Food Agric* 90: 608-614.
- Rana, V. S. & Blazquez, M. A. 2003. Chemical composition of the volatile oil of *Ageratum conyzoides* aerial parts. *The International Journal of Aromatherapy* 13: 203-206.
- Vieira, S. S. et al. 2012. Composição química e atividade fungitóxica do óleo essencial de *Ageratum conyzoides* L. (Mentrasito). *Magistra* 24: 55-62.