



REF – ISSN 1808-0804 Vol. XI (1), 11 – 20, 2014.

IDENTIFICAÇÃO DE CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Solanum jamaicense* (SOLANACEAE) E SEU POTENCIAL FUNGICIDA SOBRE *Candida albicans in vitro*

*IDENTIFICATION OF CLASS THE SECONDARY METABOLITES IN LEAVES EXTRACTE THANOLIC *Solanum jamaicense* (SOLANACEAE) AND ITS POTENTIAL FUNGICIDE ABOUT *Candida albicans in vitro**

*IDENTIFICACIÓN DE CLASES DEL METABOLITOS SECUNDARIOS EN EXTRACTO ETANOLICO DE HOJAS del *Solanum jamaicense* (Solanaceae) Y SU POTENCIAL EN FUNGICIDA *Candida albicans in vitro**

Josiane Santana Anselmo¹, Renato Abreu Lima^{2*}

¹Faculdade São Lucas

²Universidade Federal do Amazonas - UFAM

*E-mail: renatoabreu07@hotmail.com

Recebido em 10/12/2013, Aceito em 07/02/2014.

RESUMO: O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do extrato etanólico das folhas de *S. jamaicense* sobre *C. albicans in vitro*, bem como identificar as principais classes de metabólitos secundários. O material foi coletado, pesado e devidamente secado foi submetido à extração em etanol 95% por sete dias. Posteriormente, o material foi filtrado e submetido ao processo de destilação simples. No Laboratório de Microbiologia, discos de 5 mm de diâmetro de culturas de isolados do fungo *C. albicans*, foram colocados no centro de placas de Petri contendo (BDA), sendo que, na área periférica das placas, foram dispostos simetricamente discos de papel-filtro, que foram embebidos em 1mL de extrato vegetal. Como controle positivo, utilizaram-se discos embebidos em água destilada e controle negativo, o produto químico Kasumin[®]. O

extrato etanólico foi submetido ao teste para identificação de metabólitos secundários. Verificou-se que o extrato etanólico das folhas de *S. jamaicense* apresentou potencial fungicida sobre *C. albicans*, notando-se que no final de 144 horas, a média de inibição das colônias dos fungos utilizando o extrato vegetal foi de 0,9mm; no controle positivo, a média foi de 1,42 mm, enquanto que no controle negativo, a inibição média foi de 1,62 mm.

PALAVRAS-CHAVE: Análise fitoquímica. Unha-de-gato. Fungicida botânico. Planta Medicinal.

ABSTRACT: The present study aimed to evaluate the effect of ethanol extract of the leaves of *S. jamaicense* in *C. albicans in vitro* and identify the main classes of secondary metabolites. The material was collected and after being duly weighed and dried was subjected to extraction in 95% ethanol for seven days. Subsequently, the material was filtered and subjected to simple distillation process. In the Laboratory of Microbiology, 5 mm diameter discs containing cultures of the fungus *C. albicans*, were placed in the center of Petri dishes (PDA). In the peripheral area of the plates were symmetrically arranged filter paper disc soaked in 1 mL of plant extract. As a positive control, we used disc soaked in distilled water negative control, chemical Kasumin®. The ethanol extract was subjected to the test for identification of secondary metabolites. It was found that the ethanol extract of the leaves of *S. jamaicense* presented potential fungicide on *C. albicans*, noting that at the end of 144 hours, the average inhibition of fungal colonies using the plant extract was 0.9 mm in the positive control, the average was 1.42 mm, whereas the negative control, the mean inhibition was 1.62 mm.

KEY-WORDS: Phytochemical Analysis. Cat's claw. Botanical fungicide. Medicinal plant.

RESUMEN: El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto del extracto etanólico de las hojas de *S. jamaicense* en *C. albicans in vitro* e identificar las principales clases de metabolitos secundarios. Se recogió el material de, pesó y se seca adecuadamente se sometió a extracción en etanol al 95 % durante siete días. Posteriormente, el material se filtró y se sometió a proceso de destilación simple. En el Laboratorio de Microbiología, discos de 5 mm de diámetro aislado a partir de cultivos del hongo *C. albicans*, se colocaron en el centro de placas de Petri (PDA), y que en la zona periférica de las placas se dispuestos simétricamente discos de papel de filtro, que se empaparon en 1 mL de extracto de la planta. Como control positivo, se utilizó discos empapados en control negativo agua destilada, producto químico Kasumin®. El extracto de etanol se sometió a la prueba para la identificación de metabolitos secundarios. Se encontró que el extracto de etanol de las hojas de *S. jamaicense* presenta potencial

fungicida em *C. albicans*, observando que em el final de 144 horas, la inhibición media de colonias de hongos utilizando el extracto de hierbas de 0,9 mm em el control positivo, el promedio fue de 1,42 mm, mientras que el control negativo, significa inhibición fue 1,62 mm.

PALABRAS-CLAVE: Análisis fitoquímico. La uña de gato. Fungicida botánico. Planta medicinal.

INTRODUÇÃO

Desde o princípio da história do estudo de doenças e da busca de curas, o homem recorre à natureza em busca de plantas que sirvam de medicamento. Tal conhecimento foi por muito tempo considerado apenas como sabedoria popular sem preocupação de estudos mais aprofundados sobre as propriedades das plantas (DUTRA, 2009).

Nos dias atuais, este estudo é um dos enfoques da saúde pública em diversos países inclusive no Brasil, sendo amparado pelo próprio Ministério da Saúde por meio de políticas públicas populares, além de ser tema recorrente que ajuda a movimentar a enorme indústria dos medicamentos (AGRA, 1999).

O Brasil dispõe da maior diversidade de plantas vegetativas do planeta, vindo a ser local de inúmeros estudos unilaterais, realizados ou patrocinados por indústrias que utilizam de propriedades das plantas para a fitoterapia, cosmetologia e farmacologia (REX et al., 2000).

Conforme Fóglio et al. (2006), as plantas medicinais têm sido uma rica

fonte para obtenção de moléculas para serem exploradas terapêuticamente. Muitas substâncias isoladas de plantas continuam sendo fontes de medicamentos sendo seu estudo cada vez mais evidente. A família Solanaceae está constituída de cerca de 106 gêneros e 2.300 espécies, com distribuição cosmopolita, sendo a América do Sul como um dos principais centros de diversidade e endemismo (Hunziker, 2001).

Hernandes et al. (2011) verificaram que o gênero *Solanum* da família Solanaceae, compreende cerca de 3000 espécies espalhadas pela América do Sul, desde o Sul do Brasil até a Colômbia. *S. jamaicense* possui nome vulgar de Tomatilio na cidade de Guápiles, Costa Rica. A mesma é rica em glicoalcaloides saponinas que são compostos de grande interesse farmacêutico.

Encontrado com muita frequência no estado de Rondônia bem como em toda Região Norte, a *S. jamaicense* é utilizado na cultura popular como infusão para combater inflamações em geral, problemas digestivos, nas cicatrizações e nas hipoglicemias (SOARES et al., 2008).

Diante das limitações de uso dos antifúngicos sintéticos, evidenciadas pelo aumento da resistência pelos microrganismos, bem como pelas reações indesejadas apresentadas pelos usuários, novos agentes são propostos na tentativa de minimizar tais ocorrências. Nesse sentido, considerando a ampla atividade biológica apresentada pelos produtos de origem natural, extratos obtidos a partir do gênero *Solanum* têm sido investigados para determinação da atividade antimicrobiana (REX et al., 2000).

Considerando essa realidade é que foi avaliada a atividade antifúngica do extrato etanólico das folhas de *S. jamaicense* sobre *C. albicans in vitro*, bem como o reconhecimento dos principais classes de metabólitos secundários.

S. jamaicense é descrita como um subarbusto de até 1,3 m de altura, caule esverdeado, cilíndrico, com aspecto em ziguezague, piloso (pêlos estrelados); aculeado. Folhas geminadas, sendo uma sempre maior que a outra. Folhas maiores de 15-21 cm de comprimento e 7-13 cm de largura, assimétricas, sublobadas, ápice agudo a acuminado, base atenuada, pilosa, acúleos na nervura central; pecíolo quase nulo, piloso. Inflorescência tipo cimeira extra-axilar, não ramificada; flores com cerca de 1 cm comprimento, 1,7 cm diâmetro; cálice fundido, persistente no fruto, 5 dentado, piloso, aculeado; corola alva, profundamente fendida, 5 dentada,

dentadas lanceoladas com cerca de 1 cm comprimento; 5 estames epipétalos, fundidos na base; anteras amarelas, bitecas, com cerca de 6 mm comprimento, atenuadas, deiscência poricida; ovário bilocular, glabro; estilete piloso, 7,5 mm comprimento; estigma exserto. Baga alaranjada quando madura, até 9 mm diâmetro, glabra. Sementes numerosas, amarelas e achatadas (AGRA et al., 2009).

Os fungos são seres encontrados nos mais diversos ambientes, tais como: vegetais, ar atmosférico, solo e água. As leveduras do gênero *Candida* são normalmente encontradas como membros da microbiota normal humana, podendo estar presentes nas mucosas da boca e dos tratos digestivo, genitale urinário de indivíduos sadios, sendo capazes de desencadear o aparecimento de infecções, chamadas candidíases, principalmente em pessoas com fatores predisponentes (ROCHA et al., 2011).

Candida albicans é o patógeno mais comum nas candidíases cutâneas e da orofaringe, porém as espécies não *albicans* têm aumentado em número e em importância nas candidíases vaginal e sistêmica (REX et al., 2000).

Devido à escassez de trabalhos relacionados a esta área, buscou-se por meio do presente estudo, verificar a presença de metabólitos secundários em *S. jamaicense* que possam ser utilizados como propriedades farmacêuticas. Para isso, foi analisado fitoquimicamente o extrato etanólico, com o objetivo de

avaliar sua atividade antifúngica sobre *C. albicans in vitro*.

MATERIAL E MÉTODO

LOCAL DE COLETA

O material foi coletado na BR 364, km 13 próximo ao município de Candeias do Jamari-RO. A identificação botânica foi realizada pelo envio de uma excisata ao Herbário Dr. Ary Tupinambá Penna Pinheiro da Faculdade São Lucas-HFSL, encontrando-se registrada sob o Nº de 005182. Após a coleta, as folhas foram pesadas frescas, e em seguida, colocados para secar em estufa elétrica a 30-50°C durante três dias a partir das folhas devidamente secas e trituradas. Adicionaram-se 800 mL de etanol 95%, por sete dias, em quatro repetições. Posteriormente, o extrato foi filtrado e submetido ao processo de destilação simples.

PREPARAÇÃO DE EXTRATO

A análise de metabólitos secundários foi realizada na composição do extrato bruto das folhas de *S. jamaicense*. Para a extração do extrato vegetal da planta foi realizado no Laboratório de Fitoquímica da Faculdade São Lucas, e no Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais da Universidade Federal de Rondônia (UNIR).

Após coleta, o material foi levado ao laboratório para análise, onde se iniciou a limpeza, separação e

posteriormente pesagem do mesmo. Em seguida, o material foi colocado para secar em estufa a 100°C em bandejas separadas por um período de 3 a 4 dias. Posteriormente, as folhas secas foram novamente pesadas.

Em seguida, as folhas foram trituradas e colocadas em um recipiente com etanol 95% na quantidade de dois litros por sete dias em três repetições.

Após este processo, o extrato foi filtrado e submetido ao processo de destilação em evaporador rotatório, ficando somente o extrato bruto.

Em seguida, foram realizados testes fitoquímicos com o extrato etanólico das folhas, baseados em precipitação e coloração dos extratos diluídos em solução e reativos específicos para cada teste conforme metodologia proposta por Radi & Terrones (2007).

CULTURA DO FUNGO *C. albicans*

No Laboratório de Microbiologia da Faculdade São Lucas, discos de 5 mm de diâmetro de culturas de isolados do fungo *C. albicans* (ATCC 10.231) foram colocados no centro de placas de Petri contendo meio Ágar Batata Dextrose (ABD), sendo que, na área periférica das placas, foram dispostos simetricamente quatro discos de papel-filtro, que foram embebidos em 1mL de extrato vegetal durante 1 minuto, obtendo-se a 0,12 mL de extrato para cada disco. Como controle positivo, utilizaram-se discos

embebidos em água destilada e controle negativo, o produto químico Kasumin[®], ambos na concentração de 1mL. Após esse processo, as placas foram incubadas a 25°C durante seis dias. A avaliação consistiu em medir o diâmetro das colônias (média de duas medidas diametralmente opostas) após 24 horas de incubação, por seis dias, ou seja, até o momento em que as colônias fúngicas do tratamento testemunha atingiram toda a superfície da placa. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento. Cada repetição foi constituída por uma placa de Petri.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No processo do estudo desde a coleta até o extrato obtiveram-se 854,40g de material fresco, 306,29g de material seco e 60 mL de extrato vegetal das folhas de *S. jamaicense*.

Com a identificação dos componentes presentes no extrato etanólico utilizando reagentes específicos, observou-se que o mesmo apresenta metabólitos secundários, que são compostos de grande interesse na medicina tradicional. Foram verificados resultados positivos para alcaloides, triterpenos, flavonoides e saponinas. Além disso, foram encontrados glicosídeos cardiotônicos, usando o reagente de Keller-Killiani, derivados antracênicos livres, taninos e cumarinas voláteis (Tabela 1).

Tabela 1. Teste para reconhecimento de metabólitos secundários das folhas de *S. jamaicense*

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	PRESENÇA	COLORAÇÃO/ PRECIPITAÇÃO
Alcaloides	+	Marrom
Glicosídeos	+	Marrom
Cardiotônicos		
Cumarinas voláteis	+	Florescência
Flavonoides	+	Verde
Taninos	+	Verde
Saponinas	+	Presença de espuma
Triterpenos e/ou Esteroides	+	Verde
Derivados Antracênicos Livres	+	Roxo

Conforme Lopes (2005), as plantas do gênero *Solanum* são conhecidas por possuírem em sua composição química principalmente alcaloides esterodais, além de uma grande variedade de saponinas,

Sendo assim, o presente estudo não se diverge, em se tratando de resultados para metabólitos secundários, da pesquisa mostrada por Giacomini (2010) onde foi demonstrado que é bastante comum a ocorrência de variados metabólitos secundários nas espécies da família Solanaceae.

Ao realizar teste fitoquímicos na raiz do *S. jamaicense*, Kissler et al. (2012) também observaram a presença de metabólitos secundários para a classe de alcaloides, glicosídeos cardiotônicos, flavonoides e triterpenos esteroidais além da ausência de taninos, cumarinas

sapogeninas, flavonoides e glicoalcaloides. O potencial biológico de tais metabólitos secundários é descrito na literatura no combate a diversos microrganismos.

voláteis, saponinas e derivados antracênicos livres para todos os métodos de extração.

Por meio do presente estudo foi possível verificar que o extrato etanólico das folhas de *S. jamaicense* apresentou potencial fungicida sobre *C. albicans*, notando-se que no final de 144 horas, a média de crescimento das colônias dos fungos utilizando o extrato vegetal foi de 0,9 mm; no controle positivo, utilizando a água destilada estéril, a média foi de 1,42 mm, enquanto que no controle negativo, utilizando o produto químico, a inibição média foi de 1,62mm (Tabela 2).

Tabela 2. Média (mm) de inibição de crescimento do fungo *C. albicans* submetidos à exposição do extrato vegetal das folhas de *S. jamaicense in vitro* durante 144 horas. Porto Velho-RO, 2013.

Tratamento	Horas						Médias
	24	48	72	96	120	144	
Extrato vegetal	0,6a	0,8a	0,8a	1,0a	1,1a	1,13a	0,9a
Produto químico	1,2a	1,4a	1,5a	1,6a	1,86a	2,2Ab	1,62a
Água destilada	0,8a	1,16a	1,36a	1,6a	1,76a	1,83a	1,42a
Médias	0,8a	1,12a	1,22a	1,4a	1,57a	1,72a	1,31 ^a

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna, e mesma letra minúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

No presente estudo, os resultados foram positivos quando utilizado extrato vegetal do gênero *Solanum* contra *C. albicans*, possivelmente devido à presença de um ou combinação de vários metabólitos secundários. Tais resultados assemelham-se com o estudo de Costa (2012).

Resultados semelhantes foram encontrado por Alves et al. (2005) ao testar extratos brutos etanólicos das folhas e frutos verdes e maduros de *S. palinacanthum*, observando uma inibição do crescimento da levedura *C. albicans*. Além disso, Nascimento et al. (2006) relataram a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos vegetais de *S. paniculatum* Lam., sobre o crescimento da bactéria *Ralstonia solanacearum*.

Atualmente, inúmeros experimentos evidenciam o fato de que muitos metabólitos secundários presentes nas plantas, como os terpenos, alcaloides, glicosídeos cianogênicos, saponinas, taninos, antraquinonas são alelo químicos que representam caracteres adaptativos e que tem se diversificado durante a evolução pela seleção natural a fim de proteger as plantas contra vírus, bactérias, fungos, plantas concorrentes e contra os herbívoros (WINK, 2003).

Um importante fator a ser considerado quando se realiza qualquer

pesquisa envolvendo plantas medicinais e se tenta extrapolar os resultados obtidos, é quanto a fatores ambientais envolvidos no momento da coleta da planta, como sazonalidade, clima, tipo de solo e temperatura do ar.

De acordo com Freitas et al. (2004) a produção de metabólitos secundários pela planta ocorre em função da interação planta versus ambiente em resposta a fatores químicos e biológicos. Este fato pode explicar resultados divergentes de extratos da mesma espécie, mas coletado em locais e períodos diferentes.

CONCLUSÕES

O extrato etanólico das folhas de *S. jamaicense* apresentaram metabólitos secundários tais como alcaloides, glicosídeos cardiotônicos, cumarinas, taninos, saponinas, triterpenos, derivados antracênicos livres. Além disso, verificou-se que o extrato etanólico das folhas de *S. jamaicense* apresentou inibição de crescimento sobre *C. albicans*. No entanto, outras metodologias e concentrações devem ser testadas para verificar a potencialidade fungicida do extrato de *S. jamaicense*.

AGRADECIMENTOS

Aos Laboratórios de Fitoquímica e Microbiologia da Faculdade São Lucas pelo auxílio na produção do extrato etanólico e nas culturas dos fungos utilizados.

REFERÊNCIAS

1. AGRA, M. F. New Species of *Solanum* subgenus *Leptostemonum* (Solanaceae) from Chapada da Diamantina, Bahia. **Novon**, v.9, n.3, p.292-295, 1999.
2. AGRA, M.F.; KIRIAKI, N.S.; BERGER, L.R. Flora da Paraíba, Brasil: *Solanum* L. (Solanaceae). **Acta Botânica Brasílica**, v.23, n.3, p.826-842, 2009.
3. ALVES, A. A.; PIRES, A. F.; LINARDI, V. R.; REINA L. C. B.; GALVÃO, C.. In: Encontro de Pesquisa de Ies do Sistema Estadual de Minas Gerais, 3, **Anais**. Caratinga, 2005.
4. COSTA, J. C. **Heterosídeo salcaloídicos de *Solanum lycocarpum*. Avaliação das atividades contra fungos dermatófitos e câncer de pele**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Ribeirão Preto: USP, 69p. 2012.
5. COWEN, L. E.; ANDERSON, J. B.; KOHN, L. M. Evolution of drug resistance in *Candida albicans*. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, n.1, p.139-165, 2002.
6. DUTRA, M. G. **Plantas medicinais, fitoterápicos e saúde pública: um diagnóstico situacional em Anápolis, Goiás**. Dissertação (Mestrado Multidisciplinar em Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente). Anápolis: Centro Universitário de Anápolis-UniEvangélica, p.112, 2009.
7. FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Mediciniais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multiciência**, v.7, n.10, p.17-26, 2006.
8. FREITAS, M.S.M.; SOUZA, P.H.; BELLO, O.I.; JAQUES, R.S. Crescimento e produção de fenóis totais em carqueja [*Baccharis trimera*(Less.) D.C.] em resposta à inoculação com fungos micorrízico arbusculares, na presença e na ausência de adubação mineral. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.6, n.3, p.30-34, 2004.
9. GIACOMIN L. L. **Estudos taxonômicos e filogenéticos em *Solanum sect. Gonatotrichum Bitter* (Solanaceae) no Brasil**. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte: Departamento de Botânica da Universidade Federal de Minas Gerais, 2010, 121p.
10. HERNANDEZ, A. H. F.; COELHO, E. F.; FERRER, M. T. **Estudo fitoquímico preliminar do *S. jamaicense***. Reunião de Iniciação Científica PIBIC/CNPq - FSL, 2, 2010. Porto Velho: Faculdade São Lucas, p.18, 2011.
11. HUNKIKER, A.T. **The genera of Solanaceae**. A.R.G. Gantner VerlagK.-G. 2001.
12. KISSLER, T. V. L.; FEITOSA, F. T.; GONÇALVES, A. P. P.; HERNÁNDEZ, A. E. Estudo comparativo de metabólitos secundários presentes no extrato etanólico de *Solanum jamaicense* Mill por diferentes métodos de extração. **Anais da 63ª Reunião Anual da SBPC**. 2012. Disponível em <<http://www.sbpcnet.org.br/livro/63ra/resumos/resumos/3789.htm>>. Acesso em: 22 de Out. 2013.
13. LOPES, G. **Biomonitoramento dos extratos brutos e das frações glicoalcoídicas de seis espécies do gênero *Solanum* frente à *Artemia salina* e ao caramujo *Biomphalaria glabrata* e as reações com o alcaloide solasodina de *Solanum crinitum***. Dissertação (Mestrado). Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. ICE-DeQuim, 89p.2005.
14. NASCIMENTO, L. C. S.; SILVA, T. A.; ORLANDA, J. F. F. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos vegetais de *Solanum paniculatum* L. sobre o crescimento de *Ralstonia solanacearum*. In: Congresso Brasileiro de Química, n.46, **Anais...**p.16-19, 2006.
15. RADI, P. A.; TERRONES, M. G. H. Metabólitos secundários de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.20, n.2, p.18-22, 2007.
16. ROCHA, M. F. G.; AGUIAR, F. L. N.; BRILHANTE, R.S. N.; CORDEIRO, R. A.; TEIXEIRA, C. E. C.;BRANCO, D. S. C. M. C.; PAIVA, M. A. N.; ZEFERINO, J. P. O.;

MAFEZOL, J.; SAMPAIO, C. M. S.;BARBOSA, F. G.; SIDRIM, J. J. C. **Extratos de *Moringa oleifera* e *Vernonia* sp. sobre *Candida albicans* e *Microsporium canis* isolados de cães e gatos e análise da toxicidade em *Artemisa* sp..** *Cienc. Rural*, vol.41, no.10, p.1807-1812. 2011

17. REX, J. H.; WALSH, T. J.; SOBEL, J. D. Practice Guidelines for the treatment of candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v.30, n.4, p.662-678, 2000.

18. SOARES, E. L. C.; SILVA, M. V.; VENDRUSCOLO, G. S.; THODE, V. A.; SILVA, J. G.; MENTZ, L. A. A família Solanaceae no Parque Estadual de Itapuã Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v.6, n.3, p.177-188, 2008.

19. WINK, M. Evolution of secondary metabolites from anecological and molecular phylo genetic perspective. **Phytichemistry**, v.64, n.1, p.3-19, 2003.