

## Artigo

**Atividade Antifúngica do Látex de *Jatropha multifida* L. (Euphorbiaceae) e de Lupenona isolada de suas Folhas****Oliveira-Tavares, N. N.; Lemos, A. S. O; Pereira, A. P. O.; Fabri, R. L.; Chedier, L. M.\****Rev. Virtual Quim.*, 2019, 11 (5), 1579-1590. Data de publicação na Web: 29 de outubro de 2019<http://rvq.sbq.org.br>**Antifungal Activity of Latex and Lupenone from *Jatropha multifida* L. (Euphorbiaceae)**

**Abstract:** *Jatropha multifida* L. belongs to the family Euphorbiaceae, being popularly used in Brazil for treatment and healing of infected wounds, gastrointestinal ulcers and candidiasis. Lupenone, isolated from the hexane extract of its leaves, was submitted to the synergism test for *Candida tropicalis* and evaluation of its possible mechanism of antifungal action. Lupenone was able to halve the minimum inhibitory capacity (MIC) of fluconazole against *C. tropicalis* with possible action on the cell wall and ergosterol of the fungal membrane. The fraction derived from successive fractions of the aqueous latex residue, was analyzed by HPLC-DAD and tested in the antifungal assay against the following yeasts: *Candida albicans*, *Candida albicans* Serology A and B, *Candida grablata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* and *Cryptococcus neoformans*. This fraction showed a probable catechin with moderate activity against *C. tropicalis* and *C. grablata*. The presence of triterpene and polyphenols in *J. multifida* may be responsible for the antifungal and cicatrizant activities presented by the species. Lupenone may be used in combination with fluconazole in the development of a new antifungal.

**Keywords:** Catechin; *Candida*; cytotoxicity; lupenone; *Jatropha*.

**Resumo**

*Jatropha multifida* L. pertence à família Euphorbiaceae, é popularmente utilizada no Brasil para tratamento e cicatrização de feridas infectadas, úlceras gastrointestinais e candidíase. Lupenona, isolada do extrato hexânico de suas folhas, foi submetida ao teste de sinergismo para *Candida tropicalis* e avaliação do seu possível mecanismo de ação antifúngico. Lupenona se mostrou capaz de reduzir pela metade a capacidade inibitória mínima (CIM) de fluconazol contra *C. tropicalis* com possível ação na parede celular e no ergosterol da membrana fúngica. A fração oriunda de sucessivos fracionamentos do resíduo aquoso do látex, foi analisada por CLAE-DAD e testada em ensaio antifúngico contra as seguintes leveduras: *Candida albicans*, *Candida albicans* Sorologia A e B, *Candida grablata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* e *Cryptococcus neoformans*. Essa fração apresentou uma provável catequina com atividade moderada frente à *C. tropicalis* e *C. grablata*. A presença de triterpeno e polifenóis em *J. multifida* pode ser responsável pelas atividades antifúngicas e cicatrizantes apresentadas pela espécie. Lupenona pode ser utilizada em associação com fluconazol no desenvolvimento de um novo antifúngico.

**Palavras-chave:** Catequina; *Candida*; citotóxicidade; lupenona; *Jatropha*.

\* Universidade Federal de Juiz de Fora, Laboratório de Botânica Aplicada e Química Vegetal, Departamento de Botânica, ICB, Rua José Lourenço Kelmer s/n, São Pedro, CEP 36036-900, Juiz de Fora-MG, Brasil.

✉ [luciana.chedier@ufjf.edu.br](mailto:luciana.chedier@ufjf.edu.br)

DOI: [10.21577/1984-6835.20190110](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20190110)

## Atividade Antifúngica do Látex de *Jatropha multifida* L. (Euphorbiaceae) e de Lupenona isolada de suas Folhas

Naiara N. Tavares de Oliveira,<sup>a</sup> Ari Sérgio Oliveira Lemos,<sup>b</sup> Ana Patrícia de Oliveira Pereira,<sup>a,†</sup> Rodrigo Luiz Fabri,<sup>b</sup> Luciana Moreira Chedier<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal de Juiz de Fora, Laboratório de Fitoquímica, Departamento de Botânica, ICB, Rua José Lourenço Kelmer s/n, São Pedro, CEP 36036-900, Juiz de Fora-MG, Brasil.

<sup>b</sup> Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Bioquímica, ICB, Rua José Lourenço Kelmer s/n, São Pedro, CEP 36036-900, Juiz de Fora-MG, Brasil.

<sup>†</sup> *in memoriam*

\* [luciana.chedier@ufjf.edu.br](mailto:luciana.chedier@ufjf.edu.br)

*Recebido em 30 de setembro de 2019. Aceito para publicação em 30 de setembro de 2019*

1. Introdução
2. Materiais e Métodos
3. Resultados
4. Discussão
5. Conclusão

### 1. Introdução

Distribuída entre cerca de 8.910 espécies subdivididas em 322 gêneros, a família Euphorbiaceae está presente em regiões tropicais e subtropicais, com habitat que varia de florestas a regiões secas e quentes como os desertos e possui como uma de suas características marcantes a presença de látex em muitas espécies. Euphorbiaceae possui um grande potencial econômico, que se estende desde o uso medicinal, como a substância analgésica resiniferatoxina isolada do látex de *Euphorbia resinifera* O. Berg., passando pelo uso alimentício, como *Manihot esculenta* Crantz, conhecida como mandioca, macaxeira ouaipim, até o uso ornamental, como

*Jatropha multifida* L., espécie estudada no presente artigo por suas propriedades medicinais. Quanto aos aspectos químicos, a família é conhecida pela riqueza em metabólitos especiais, como terpenos, flavonoides, taninos, alcaloides e esteróis, com vários estudos comprovando suas atividades antifúngica, antibacteriana, antioxidante, entre outras.<sup>1-4</sup>

*Jatropha multifida* L. (sinônimo *Manihot multifida* (L.) Crantz) é destacada pelo seu uso medicinal contra a infecção fúngica causada pelas leveduras do gênero *Candida*, a candidíase. Seu látex, utilizado para aplicação em feridas com o objetivo de auxiliar na cicatrização, também é ingerido para o tratamento de úlceras gastrointestinais. As folhas da espécie são utilizadas para

tratamento de feridas infectadas, principalmente por portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) na África.<sup>6</sup>

Um estudo realizado em 2015 mostrou a presença de fenóis, flavonoides e de triterpenos em extratos de *J. multifida*, além de sua atividade antimicrobiana. Em 2018, outro trabalho comparou a fitoquímica e a capacidade antimicrobiana de três espécies do gênero *Jatropha*, incluindo *J. multifida*. Seus resultados, além de mostrarem que os extratos aquosos e etanólicos das folhas de *J. multifida* são ricos em taninos, flavonoides, saponinas e fenóis, comprovaram que a espécie possui atividade antibacteriana e antifúngica. Os estudos corroboram para o uso medicinal da espécie para o tratamento de infecções, feridas e cortes.<sup>6,7</sup>

Na literatura, poucos estudos relatam os metabólitos especiais que podem estar relacionados com a atividade antifúngica de *J. multifida* e com seus usos medicinais. Além disso, não há relatos de pesquisas tanto sobre a capacidade de sinergismo dessas substâncias com antifúngicos já existentes, quanto sobre possíveis mecanismos de ação dessas substâncias. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o uso popular medicinal de *J. multifida*, por meio de análise antifúngica de lupenona, isolada do extrato hexânico de suas folhas, além do estudo de sinergismo e possível mecanismo de ação dessa substância em células fúngicas. O potencial antifúngico e o perfil químico da fração isolada oriunda do látex também foram avaliados.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Material vegetal

O material vegetal utilizado neste trabalho, folhas e látex de *Jatropha multifida* L., foi coletado na Estação Experimental de Cultivo no campus da Universidade Federal de Juiz de Fora, em Juiz de Fora, Minas Gerais (21°45'51"S - 43°21'1"O).

Exemplares férteis foram coletados e herborizados e encontram-se depositados no Herbário Leopoldo Krieger, na UFJF, sob número CESJ54865.

### 2.2. Extração e fracionamento

As folhas coletadas de *J. multifida* foram fragmentadas e secas em estufa a 40 °C. O material vegetal passou por sucessivas macerações com *n*-hexano, dando origem ao extrato bruto hexânico. Visando o isolamento de substâncias, 7 g do extrato bruto foram fracionados em coluna de vidro com gel de sílica (30 x 1000 mm), sendo eluída com solventes em gradiente crescente de polaridade (*n*-hexano, acetato de etila e metanol), coletando-se 300 mL por fração e fornecendo ao final do processo, 21 frações. A fração 7 obtida nesse processo cromatográfico, com 554,6 mg, foi novamente cromatografada em coluna de vidro (30 x 1000 mm), coletando-se frações de 50 mL e fornecendo 17 frações finais. Ao final do segundo fracionamento, a fração 3, com 119,6 mg, que foi eluída em *n*-hexano/acetato de etila (99:1 v/v) aparentemente apresentou maior pureza em relação aos seus constituintes químicos quando avaliada por CCD em *n*-hexano/acetato de etila (90:10 v/v). Essa fração foi recristalizada com *n*-hexano e acetato de etila, sendo aquecida primeiramente em *n*-hexano e deixada em repouso para ocorrer o resfriamento da mesma e formação de cristais. Separou-se o sobrenadante com ajuda de pipeta Pasteur e os cristais foram solubilizados em acetato de etila à frio e deixados em repouso por um dia para que houvesse uma nova cristalização dos mesmos. Todos os processos relacionados à recristalização foram repetidos 5 vezes. Essa fração foi posteriormente enviada para análise por CG/EM e RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

O látex foi coletado por gotejamento em metanol, em seguida, filtrado, onde separaram-se precipitado e solvente, que foi submetido à extração líquido-líquido com *n*-hexano sucessivas vezes. Ao resíduo metanólico foi acrescida água destilada, e foi

particionado com clorofórmio; o resíduo metanólico/aquoso foi levado ao evaporador rotatório sob pressão reduzida para evaporação do metanol, gerando o resíduo, que, em seguida, foi liofilizado, originando o resíduo aquoso do látex de *J. multifida*.

O resíduo aquoso do látex, após liofilização (2,5 g), foi cromatografado em coluna de vidro com Sephadex LH-20 (30 x 1000 mm), eluído em metanol e tendo frações de 2 mL coletadas, com vazão de 1 gota a cada 40 segundos, resultando em 12 frações finais. As frações 5 e 6 foram reunidas (305,3 mg) e novamente cromatografadas em coluna de vidro com Sephadex LH-20 (15 x 450 mm), com eluição em metanol e tendo frações de 1 mL coletadas, com vazão de 1 gota a cada 40 segundos, originando 8 frações finais. A fração número 4 (38,8 mg) se mostrou aparentemente mais pura quando avaliada por CCD, quando eluída em acetato de etila/metanol (90:10 v/v) e revelada com vanilina 1 % e ácido sulfúrico 5 % em etanol.<sup>8</sup> Essa fração foi analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD).

### 2.3. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)

O perfil químico da fração isolada do látex foi avaliado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector por arranjo de diodo. A amostra foi solubilizada em metanol e filtrada em filtro de 45 µm. A análise foi realizada em instrumento Shimadzu UFLC, aquisição de dados e controle por software LabSolutions. A fase móvel utilizada foi um gradiente de metanol grau HPLC e água ultrapurificada MiliQ, fluxo 0,5 mL/min, coluna cromatográfica C18 (2,0 x 30) mm, partícula interna 2,2 µm Shim-pack XR-ODS. A aquisição de dados ocorreu por meio de varredura no comprimento de onda de 190 nm a 400 nm, com um tempo de análise de 26 minutos.

### 2.4. Elucidação estrutural do triterpeno lupenona

Após processo de recristalização, a fração isolada do extrato hexânico de folhas foi recristalizada e analisada por Cromatografia com Fase Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG/EM), utilizando-se um cromatógrafo com fase gasosa Hewlett Packard 6890 e MS HP5972, munido de um banco de dados WILEY 7n.1. Foi usada uma coluna capilar do tipo HP5MS (5 %-fenil)-dimetilpolisiloxano com 0,25 µm de espessura do filme, de 30 m de comprimento e 250 µm de diâmetro interno. O gás de arraste foi hélio (1 mL/min), e as separações foram realizadas com injetor a 250 °C, detector a 280 °C e a seguinte programação de temperatura: 70 °C aumentando 2 °C por minuto até a temperatura total de 290 °C. Os parâmetros da operação de EM foram 70 eV, fonte iônica 250 °C, impacto de elétrons e a semelhança dos constituintes químicos foi comparada de acordo com o perfil de fragmentação por Banco de dados WILEY.

As análises por Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foram realizadas em aparelho da marca Bruker, modelo Spect com frequência de 400 MHz para <sup>1</sup>H e 100 MHz para <sup>13</sup>C, utilizando-se como solvente clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>).

Para a realização de análises cromatográficas e espectrométricas esse trabalho contou com a colaboração da Plataforma de Metodologia Analítica de Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz.

### 2.5. Estirpes utilizadas

A fração isolada de látex e a lupenona tiveram sua atividade antifúngica avaliadas frente às estirpes *Candida albicans* ATCC 24433, *C. albicans* Sorologia A ATCC 36801, *C. albicans* Sorologia B ATCC 36802, *Candida grablata* ATCC 2001, *Candida krusei* ATCC 6258, *Cryptococcus neoformans* ATCC 66031 e *Candida tropicalis* ATCC 28707, sendo esta

última uma estirpe resistente a fluconazol, itraconazol e anfotericina B.<sup>9</sup>

## 2.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) da fração isolada de látex e da lupenona foram avaliadas por técnica de microdiluição seriada em caldo Sabouraud 2%.<sup>10</sup> Todos os testes foram realizados em volume final de 360 µL, e as placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas para todos os fungos, exceto *C. neoformans* e *C. tropicalis*, por 48h. Os valores de CIM foram calculados como a maior diluição mostrando a inibição completa da estirpe testada.

## 2.7. Determinação da concentração fúngica mínima

A concentração fúngica mínima (CFM) foi determinada através da semeadura de 10 µL de amostras das placas sem crescimento visível nos ensaios da CIM em placas de ágar Sabouraud 2 % recém preparadas.<sup>11</sup> As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas para todos os fungos, exceto *C. neoformans* e *C. tropicalis*, por 48h. ACFM foi estabelecida como a menor concentração das amostras que inibe o crescimento visível das colônias fúngicas nas placas de ágar em um novo grupo de placas.

## 2.8. Teste de sinergismo

Para avaliar os possíveis efeitos sinérgicos do triterpeno lupenona e o fluconazol foi realizado o teste de sinergismo utilizando estirpe de *C. tropicalis*.<sup>12</sup> Foi realizada uma microdiluição seriada em microplaca estéril com 96 poços utilizando caldo Sabouraud e o fluconazol na concentração de 4 CIM (2000 µg/mL) e lupenona na concentração 1 CIM (133 µg/mL). Foram separados dois poços para controle de crescimento e um poço para controle de esterilidade. A placa foi incubada

por 48h a 35 °C, sendo o resultado mensurado através da turbidez do meio.

## 2.9. Ensaio de proteção com sorbitol

Lupenona foi testada quanto a seu possível mecanismo de ação na parede celular para as leveduras que se mostraram sensíveis ao tratamento com sorbitol. Foi realizado o ensaio de proteção com sorbitol após a determinação dos valores de CIM para a substância.<sup>13</sup> Foi realizada uma microdiluição seriada em microplaca estéril de 96 poços usando caldo Sabouraud enriquecido com sorbitol 0.8 mol/L. A solução estoque de lupenona foi diluída em concentrações decrescentes de 532 a 2,07 µg/mL. Os valores de CIM foram determinados após incubação por 48h em 35 °C.

## 2.10. Ensaio de ligação em ergosterol exógeno

O ensaio Efeito em ergosterol avaliou a capacidade da lupenona em se ligar ao ergosterol da membrana fúngica, através do valor encontrado para CIM na presença de ergosterol exógeno.<sup>14</sup> Uma microdiluição seriada foi realizada em placa estéril de 96 poços, usando caldo Sabouraud enriquecido com ergosterol 400 µg/mL. A solução estoque de lupenona foi diluída em concentrações decrescentes de 532 a 2,07 µg/mL. Os valores de CIM foram determinados após incubação por 48h em 35 °C.

## 2.11. Ensaio de inibição da bomba de efluxo

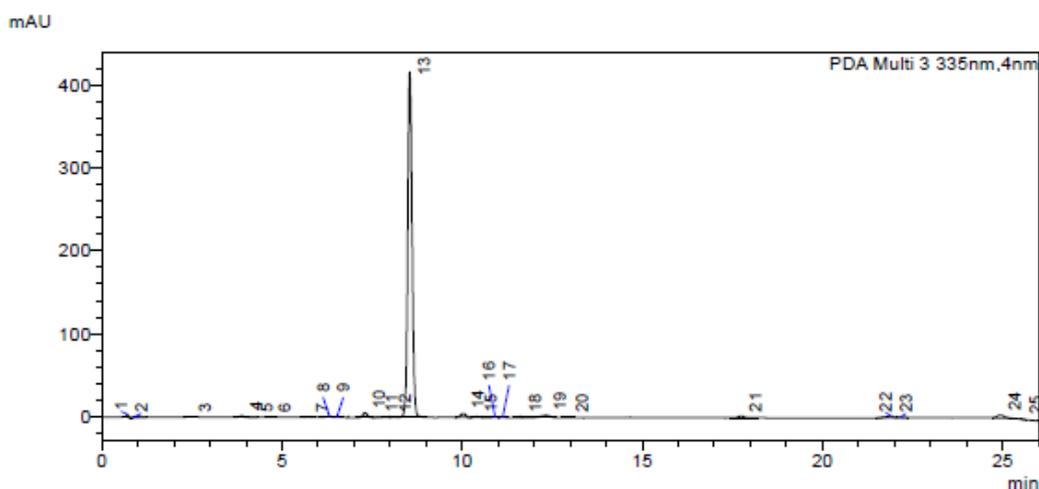
Lupenona também foi avaliada quanto a seu possível efeito sobre as bombas de efluxo. Foi realizado um teste fenotípico pela inibição do mecanismo de resistência fúngica ao fluconazol, às bombas de efluxo, na presença de baixas concentrações de lupenona.<sup>15</sup> As estirpes fúngicas consideradas resistentes

segundo suas ATCCs e perante um ensaio prévio com o fluconazol (CIM  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ ) foram testadas com prometazina (12,5 a 0,01  $\mu\text{g/mL}$ ), um inibidor de bombas de efluxo do plasma, e tiveram seu valor de CIM determinado por meio de uma microdiluição seriada. O teste de inibição de bomba de efluxo foi posteriormente executado contra o fluconazol em concentrações que variaram de 250 a 3,9  $\text{mg/mL}$ . Ao fim da inoculação, foi adicionado  $\frac{1}{4}$  da CIM de lupenona (33,35  $\mu\text{g/mL}$ ).

### 3. Resultados

#### 3.1. Análises cromatográficas da fração isolada do látex de *J. multifida*

Após revelação com vanilina sulfúrica, a fração isolada do látex apresentou, em cromatografia de camada delgada, uma mancha com coloração de marrom avermelhada. A análise em CLAE-DAD da mesma apresentou um sinal com tempo de retenção de 8,546 minutos (sinal 13), como pode ser observado na Figura 1. Este sinal apresentou 91 % da área total do cromatograma no comprimento de onda de 335 nm (Figura 1). O espectro de absorção foi adquirido por meio de varredura entre os comprimentos de onda de 190 nm a 400 nm, sendo que o mesmo apresentou máximos de absorção compatíveis com a catequina: 199 nm e 286 nm (Figura 2).<sup>18, 19</sup>



**Figura 1.** Perfil cromatográfico por CLAE-DAD da fração isolada do látex de *Jatropha multifida* L. analisado no comprimento de onda de 335 nm

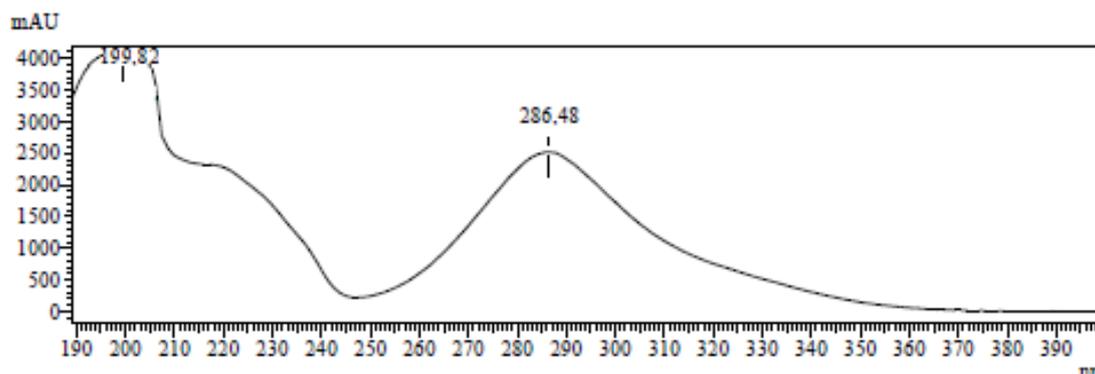


Figura 2- Espectro de ultravioleta fração isolada do látex de *Jatropha multifida* L

### 3.2. Isolamento e identificação do triterpeno lupenona

O resultado do perfil químico da fração isolada do extrato hexânico de folhas por CG/EM indicou um sinal com 100 % de área do cromatograma que apresentou espectro de massas com íon molecular em ( $M^+$ ) 424, sinal base em  $m/z$  205 (100 %) e fragmentos de menores intensidades em  $m/z$  109 (61 %), 95 (58 %), 93 (50 %) e 121 (50 %) que foram comparados com o banco de dados WILEY. A análise por RMN  $^1H$  confirma o resultado obtido por EIMS. Foram encontrados nove simpletos, sendo sete atribuídos a metilas e dois ao carbono 29, além de um multipletto:  $\delta$  0,79; 0,94; 0,95; 1,02; 1,25; 1,35; 1,68 (3H, s, 7 x metila); 2,14 (m, H-19); 4,57 (s, Ha-29); 4,69 (s, Hb-29). Já por RMN  $^{13}C$  foram encontrados 30 sinais:  $\delta$  14,47 (C-27); 15,78 (C-25); 15,97 (C-26); 18,01 (C-28); 18,31 (C-30); 19,67 (C-6); 21,03 (C-24); 21,46 (C-11); 25,14 (C-12); 26,64 (C-23); 27,42 (C-15); 29,82 (C-21); 33,55 (C-7); 34,1 (C-2); 35,51 (C-16); 36,87 (C-10); 38,16 (C-13); 39,61 (C-1); 40,77 (C-22); 42,88 (C-8); 42,99 (C-14 e C-17); 47,33 (C-4); 47,95 (C-19); 48,23 (C-18); 49,78 (C-9); 54,91 (C-5); 109,39 (C-29); 150,87 (C-20); 218,22 (C-3). Desta forma a identificação do triterpeno lupenona foi confirmada através da análise estrutural comparada com os espectros da literatura.<sup>16</sup>

### 3.3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fúngica Mínima (CFM)

O teste para avaliar a CIM de lupenona indicou atividade antifúngica promissora, com concentração inibitória mínima de 133  $\mu\text{g/mL}$ , para *C. tropicalis* com ação fungistática. A fração isolada do látex apresentou atividade também fungistática para *C. grubata* e *C. tropicalis* com CIM de 100  $\mu\text{g/mL}$ . Não foi possível encontrar a concentração fungicida mínima para esse ensaio, uma vez que todos valores de CIM das amostras mostraram-se fungistáticos (CIM $\neq$ CFM).

### 3.4. Sinergismo entre lupenona e fluconazol

Os resultados encontrados mostraram que a lupenona em concentração de 1,05  $\mu\text{g/mL}$  é capaz de reduzir pela metade a concentração inibitória mínima de fluconazol necessária para inibir o crescimento fúngico de *C. tropicalis*, estirpe resistente a fluconazol. O CIM do fluconazol passou de 500  $\mu\text{g/mL}$  para 250  $\mu\text{g/mL}$ . O efeito de lupenona sobre o fluconazol é um efeito aditivo (0,508).

### 3.5. Efeito de lupenona sobre o envelope fúngico

Os testes de proteção com sorbitol e ligação com ergosterol foram executados para

avaliar o efeito da lupenona sobre a parede celular fúngica e a membrana plasmática, respectivamente, de *C. tropicalis*. Lupenona na presença de sorbitol teve seu valor de CIM aumentado de 133 µg/mL para 532 µg/mL. O mesmo aumento foi encontrado para a lupenona na presença de ergosterol exógeno (532 µg/mL). Os resultados obtidos indicam uma possível ação da lupenona no envelope fúngico.

### 3.6. Lupenona e a inibição de bombas de efluxo

Inicialmente, prometazina foi utilizada para confirmar a resistência de *C. tropicalis*, uma vez que esse fármaco pode agir como um inibidor de bomba de efluxo e aumentar a atividade dos antifúngicos, para isso seu valor de CIM foi previamente mensurado (3,12 µg/mL). Em seguida prometazina foi testada no valor de ¼ de CIM junto com o fluconazol, demonstrando uma redução da CIM para esse antifúngico para 31,25 µg/mL (CIM anterior >250 µg/mL). Após realizado o ensaio para o padrão, lupenona foi avaliada e não apresentou atividade para esse ensaio de mecanismo de resistência, uma vez que o CIM de fluconazol se manteve o mesmo na presença do composto (>250 µg/mL). Para que o resultado fosse positivo, era esperada uma redução do CIM de fluconazol para a mesma quantidade de inóculo, indicando que haveria uma diminuição do mecanismo de resistência ao antifúngico.

## 4. Discussão

*J. multifida* é uma espécie utilizada pela população para fins ornamentais e medicinais. Suas folhas e látex são utilizados em feridas e no tratamento da candidíase, causada por leveduras do gênero *Candida* spp.<sup>6</sup> Em vista de seu uso medicinal, o presente trabalho estudou a presença de metabólitos especiais

que possam justificar a atividade farmacológica da espécie.

O estudo do látex forneceu uma substância que, com a comparação de espectro de UV com dados da literatura, sugerem a estrutura da catequina, um flavonoide da família dos flavan-3-óis. As catequinas são unidades monoméricas das proantocianidinas.<sup>8,18,19</sup> Assim como seu potencial cicatrizante, a atividade antimicrobiana das proantocianidinas também é descrita na literatura.<sup>20-23</sup> A capacidade antifúngica da catequina presente nesta fração pode também ser a provável explicação de sua ação farmacológica nas infecções causadas pelas leveduras do gênero *Candida*, pois a mesma possui ação fungistática contra *C. grallata* e *C. tropicalis*, possivelmente atuando por meio da inibição do crescimento fúngico e permitindo uma resposta mais eficiente do sistema imunológico humano. A estirpe de *C. tropicalis* testada apresenta resistência a um dos antifúngicos mais utilizados atualmente, o fluconazol.<sup>9</sup> A descoberta de novas substâncias com potencial antifúngico para estirpes já resistentes aos fármacos atuais é de grande importância, ampliando as possibilidades de tratamento e cura dessas infecções.

As análises químicas realizadas com a fração isolada do extrato hexânico de folhas confirmam a presença de lupenona, um triterpeno pentacíclico com esqueleto lupano. Os triterpenos pentacíclicos possuem um amplo espectro de ações farmacológicas e importante atividade biológica. Essa substância é encontrada em diversas famílias, incluindo Euphorbiaceae.<sup>17</sup>

A lupenona oriunda do extrato hexânico de folhas de *J. multifida* apresentou potencial antifúngico à mesma estirpe de *C. tropicalis* resistente a fluconazol.<sup>9</sup> Devido a essa característica, foi avaliada se a substância poderia possuir ação sinérgica com o fármaco na qual a estirpe é resistente. Verificou-se que a lupenona possui efeito aditivo ao fluconazol, de forma que ela foi capaz de reduzir pela metade a quantidade de fármaco necessária para inibir o crescimento fúngico da mesma

quantidade de inóculo. O resultado encontrado para esse teste mostra que lupenona é capaz de afetar o mecanismo de resistência fúngica da levedura ao fluconazol. Dessa forma, pode ser possível elaborar um novo medicamento: uma associação de lupenona e fluconazol.

A resistência a agentes antimicrobianos em geral é um problema global para a saúde pública, essa resistência aumenta a mortalidade e morbidade daqueles que sofrem com as patologias causadas por esses microrganismos. Como alternativa, há a possibilidade da descoberta de novos agentes antimicrobianos, o que é a cada dia mais escasso, sendo uma alternativa a descoberta de produtos naturais com ação farmacológica desejada.<sup>31</sup> Outra alternativa seria a associação de fármacos: a terapia combinada traz vantagens frente ao uso de apenas um medicamento, uma vez que, com a associação de substâncias, podem-se reduzir tanto a toxidez do agente antimicrobiano quanto seus efeitos adversos, pois será necessária uma menor dose do mesmo para alcançar maior eficácia. A associação promove também o aumento do espectro antimicrobiano, assim como o combate ao surgimento de novos organismos resistentes. Outra vantagem da terapia combinada é a obtenção do sinergismo entre as substâncias, sendo a eficácia da associação maior que a soma de seus efeitos isolados.<sup>24,25,29</sup>

Os resultados encontrados são promissores, pois, além de se tratar de uma terapia combinada, envolve o uso de um potencial fitoterapêutico. A combinação de lupenona e fluconazol pode retardar o desenvolvimento de resistência ao microorganismo e melhorar o resultado da terapia para infecções causadas por *C. tropicalis*.

Avaliou-se o possível mecanismo de ação antifúngico da lupenona frente ao envoltório fúngico: parede celular e membrana fúngica, e se a substância diminui a resistência fúngica inibição de bombas de efluxo.

A parede celular é o primeiro contato da imunidade inata: células Natural killer,

complemento, proteínas plasmáticas e células fagocíticas, do hospedeiro com o fungo, além de fornecer suporte osmótico, estabelecem o formato celular e proteção física à levedura.<sup>27,28,31</sup> Lupenona foi testada em meio à presença do protetor osmótico sorbitol. Essa substância forma uma camada externa protetora deixando a célula na forma de protoplasma, permitindo que a mesma, em caso de perda de sua parede celular, não se torne hipotônica e sofra morte celular.<sup>14, 29</sup> Observou-se que a lupenona atua na parede celular, pois a CIM, necessária para inibir o crescimento fúngico da mesma quantidade de inóculo, aumentou consideravelmente, mostrando que a célula fúngica foi protegida pelo sorbitol. A literatura traz estudos mostrando que os metabólitos especiais atuam na parede celular, como substâncias fenólicas, que possuem a capacidade de formar poros na parede celular, provocando o extravasamento do citoplasma e causando a morte celular.<sup>29,31</sup>

Outro mecanismo de ação testado foi a ação no ergosterol de membrana fúngica. O ergosterol é uma substância essencial para essa célula, por ser capaz de fornecer a fluidez da membrana, função e síntese da membrana plasmática. Devido ao fato de que esse esterol existe apenas na célula fúngica e não nas células de mamíferos, ele se torna um alvo seletivo para os antifúngicos, buscando-se, assim, novas substâncias que atuem especialmente no ergosterol, não causando efeito adversos nas células humanas.<sup>26, 30, 31</sup> Substâncias que atuam no ergosterol da membrana tendem a ligar-se no ergosterol exógeno, que está no meio enriquecido, desviando sua atividade do ergosterol da membrana fúngica. Consequentemente, será necessária uma maior quantidade da substância testada para inibir o crescimento fúngico da mesma quantidade de inóculo.<sup>29</sup> O resultado encontrado para o teste com lupenona apresentou um aumento notável no valor de CIM, indicando que a mesma atua nesse ergosterol da membrana, portanto a ação antifúngica de lupenona se mostra seletiva para as células fúngicas.

Em relação ao ensaio de inibição de bombas de efluxo, foi observado que a lupenona não age nessa via, diferente da prometazina, que inibiu este mecanismo de resistência. Esse ativo já é descrito na literatura como inibir de bombas de efluxo codificadas pelos genes Cdr1 e Cdr2, relacionados com a diminuição da atividade de azólicos, como o fluconazol.<sup>15</sup>

## 5. Conclusão

*Jatropha multifida* possui lupenona em suas folhas, triterpeno que possui ação antifúngica frente à estirpe resistente a fluconazol, *C. tropicalis*, com possível mecanismo de ação antifúngica na parede celular e ergosterol da membrana. Avaliou-se a ação de lupenona junto ao fluconazol, descobrindo que existe um provável efeito aditivo entre as duas substâncias.

No látex de *J. multifida* foi encontrada uma substância com dados químicos compatíveis com a catequina, que também possui ação antifúngica à mesma estirpe de *C. tropicalis* e *C. grallata*. Os resultados encontrados neste trabalho são promissores porque fundamentam o uso medicinal popular de *J. multifida* em feridas, úlceras estomacais e no tratamento de infecção fúngica causada por *Candida* spp, assim como trazem a possibilidade de uma nova associação entre lupenona e fluconazol, que pode beneficiar a terapia de infecções causadas por *C. tropicalis*, assim como retardar o mecanismo de resistência dessa levedura ao fluconazol.

### Referências Bibliográficas

- <sup>1</sup> Sen, S.; Dehury, B.; Sahu, J.; Rathi, S.; Yadav, R. N. S. Mining and comparative survey of EST–SSR markers among members of Euphorbiaceae family. *Molecular Biology Reports* **2018**, *45*, 453. [CrossRef]
- <sup>2</sup> Peng; Q.; Li, G.; Ma, Y.; Huang, J.; Wei, X.; Wang, J. Chemical constituents of *Euphorbia kansui*. *Biochemical Systematics and Ecology* **2012**, *43*, 64. [CrossRef]
- <sup>3</sup> Mwine, J.T.; Damme, P.V. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. *Journal of Medicinal Plants Research* **2011**, *5*, 652. [Link]
- <sup>4</sup> Sabandar, C.W.; Ahmat, N.; Jaafar, F.M.; Sahidin, I. Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): A review. *Phytochemistry* **2013**, *85*, 7. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>5</sup> Bach, L. T.; Dung, L. T.; Tuan, N. T.; Phuong, N. T. Kestemont, P.; Quetin-Leclercq, J.; Hue, B. T. H. The protective effect of some extracts and isolated compounds from *Euphorbia hirta* on pancreatic B-Cells MIN6. *Vietnam Journal of Chemistry* **2018**, *56*, 637. [CrossRef]
- <sup>6</sup> Fabri, R. L.; Sá, D. S.; Pereira, A. P. O.; Scio, E.; Pimenta, D. S.; Chedier, L. M. Antimicrobial, antioxidante and cytotoxicity potential of *Manihot multifida* (L.) Crantz (Euphorbiaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **2015**, *87*, 1, 1. [CrossRef]
- <sup>7</sup> Ajayi, O. A.; Attah, O. T.; Lawal, I. A. Comparative Phytochemical and Antimicrobial Studies of Leaf Extracts of Three species of *Jatropha*. *Technology (ICONSEET)* **2018**, *3*, 44. [Link]
- <sup>8</sup> Wagner, H.; Bladt, S.; *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*, 2nd Ed., Springer Verlag: Berlin, 1996.
- <sup>9</sup> de Macedo-Silva, S. T.; Visbal, G.; Urbina, J. A.; de Souza, W.; Rodrigues, J. C. F. Potent In Vitro Antiproliferative Synergism of Combinations of Ergosterol Biosynthesis Inhibitors against *Leishmania amazonensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2015**, *59*, 6402. [CrossRef]
- <sup>10</sup> (CSLI). CaLSI.; *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 27th ed., 2017.

- <sup>11</sup> Spencer, A. L. R.; Spencer J. F. T. eds.; *Public Health Microbiology: Methods and Protocols*. Humana Press: New Jersey, 2004.
- <sup>12</sup> White, R. L.; Burgess, D. S.; Manduru, M., Bosso, J. A. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob Agents Chemother* **1996**, *40*, 1914. [[CrossRef](#)]
- <sup>13</sup> Frost, D. J.; Brandt, K. D.; Cugier, D.; Goldman, R. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. *The Journal of Antibiotics* **1995**; *48*, 306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>14</sup> Leite, M. C.; Bezerra, A. P.; de Sousa, J. P.; Guerra, F. Q.; Lima, E. de O. Evaluation of Antifungal Activity and Mechanism of Action of Citral against *Candida albicans*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2014**, 2014:378280. [[CrossRef](#)]
- <sup>15</sup> Castelo-Branco, D. S.; Brilhante, R. S.; Paiva, M. A.; Teixeira, C. E.; Caetano, E. P.; Ribeiro, J. F.; Azole-resistant *Candida albicans* from a wild Brazilian porcupine (*Coendou prehensilis*): a sign of an environmental imbalance? *Medical Mycology* **2013**, *51*, 555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>16</sup> Jash, S. K.; Gangopadhyay, A.; Sarkar, A.; Gorai, D. Phytochemical investigation of the hexane extract of stem bark of *Peltophorum pterocarpum* (DC.). *Revista Der Pharma Chemica* **2013**, *5*, 49. [[Link](#)]
- <sup>17</sup> Xu, F.; Huang, X.; Wu, H.; Wang, X. Beneficial health effects of lupenone triterpene: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2018**, *103*, 198. [[CrossRef](#)]
- <sup>18</sup> Aires, P. S. R.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, 2016. [[Link](#)]
- <sup>19</sup> Torres, F. R. L.; Carrillo, L. J. L.; *Monografia de Conclusão de Curso*, Universidad de Ciencias Ambientales y Aplicadas U.D.C.A Facultad de Química, Bogotá, 2016. [[Link](#)]
- <sup>20</sup> Passaretti T.; Guarnieri. A. P.; Filipini, R., Alves, B. C. A.; Fonseca, F. L. A. Eficácia do uso do Barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*) no processo de cicatrização em lesões: uma revisão de literatura. *ABCS Health Science* **2016**, *41*, 51. [[CrossRef](#)]
- <sup>21</sup> Kumari, S. J.; Sangeetha, M.; Ali, S. Formulation and evaluation of herbal gel from tannin-enriched fraction of *Psidium guajava* Linn. leaves for diabetic wound healing. *International Journal of Green Pharmacy* **2018**, *12*, 3. [[Link](#)]
- <sup>22</sup> Holnik, P. R., Hussein, A. A., Souza, B. M. C., Coldebella, P. F., Shimabuku Jr, R. S., Leite, N. K. Comparação do teor de taninos entre duas espécies de espinheira-santa (*Maytenus aquifolium* Mart. e *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek) cultivadas no Horto Medicinal do Refúgio Biológico Bela Vista - RBBV da Itaipu Binacional - Foz do Iguaçu, PR - Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **2015**, *17*, 385. [[CrossRef](#)]
- <sup>23</sup> de Freitas, A. L. D.; Kaplum, V.; Rossi, D. C. P.; da Silva, L. B. R.; Melhem, M. S. C.; Taborda, C. P.; de Mello, J. C. P.; Nakamura, C. V.; Ishida, K. Proanthocyanidin polymeric tannins from *Stryphnodendron adstringens* are effective against *Candida* spp. isolates and for vaginal candidiasis treatment. *Journal of Ethnopharmacology* **2018**, *24*, 184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>24</sup> Worthington, R. J.; Melander, C. Combination approaches to combat multidrug-resistant bacteria. *Trends in Biotechnology* **2013**, *31*, 3. [[CrossRef](#)]
- <sup>25</sup> Tamma, P. D.; Cosgrove, S. E.; Maragakis, L. L. Combination Therapy for Treatment of Infections with Gram-Negative Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews* **2012**, *25*, 450. [[CrossRef](#)]
- <sup>26</sup> Jäger, A. K.; Freiesleben, S. H. Correlation between Plant Secondary Metabolites and Their Antifungal Mechanisms – A Review. *Medicinal & Aromatic Plants* **2014**, *3*, 2. [[CrossRef](#)]
- <sup>27</sup> de Rossi, T.; Lozovoy, M. A. B.; da Silva, R. V.; Fernandes, E.V.; Geraldino, T. H.; Costa, I. C.; Saridakis, H. O.; Watanabe, M. A. E.; Felipe, I. Interações entre *Candida albicans* e Hospedeiro. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde* **2011**, *32*, 15. [[CrossRef](#)]

- <sup>28</sup> Fukuda, E. K.; Vasconcelos, A. F. D.; Matias, A. C.; Barbosa, A. M.; Dekker, R. F. H.; da Silva, M. L. C. Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização. *Semina: Ciências Agrarias* **2009**, *30*, 117. [[CrossRef](#)]
- <sup>29</sup> Guerra, F. Q. S.; de Araújo, R. S. A.; de Sousa, J. P. Evaluation of Antifungal Activity and Mode of Action of New Coumarin Derivative, 7-Hydroxy-6-nitro-2H-1-benzopyran-2-one, against *Aspergillus* spp. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2015**. [[CrossRef](#)]
- <sup>30</sup> Moreira, L. S.; Doria, A. C. O. C.; Santos, T. B.; Figueira, F. R. Sorge, C. P. C.; da Silva, A. M.; Khouri, S. Estudo da resistência aos antifúngicos de leveduras isoladas de candidúrias de um hospital de médio porte. *Univap* **2017**, *23*, 43. [[CrossRef](#)]
- <sup>31</sup> Lagrouh, F.; Dakka, N.; Bakri, Y. The antifungal activity of Moroccan plants and the mechanism of action of secondary metabolites from plants. *Journal de Mycologie Médicale* **2017**, *27*, 303. [[CrossRef](#)]