



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
UNIDADE ACADÊMICA DE ENFERMAGEM
GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM**

**ESTUDO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DE *Erythroxyllum subrotundum* SOBRE CEPAS
DO GÊNERO *Candida***

FAGNER ARRUDA DE LIMA

**CAMPINA GRANDE-PB
MARÇO DE 2017**

ORIENTADORA: CRISTINA RUAN FERREIRA DE ARAÚJO

ORIENTANDO: FAGNER ARRUDA DE LIMA

**ESTUDO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DE *Erythroxyllum subrotundum* SOBRE CEPAS
DO GÊNERO *Candida***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Enfermagem da UFCG/CCBS
como requisito para a conclusão do
componente curricular TCC II.

CAMPINA GRANDE-PB

MARÇO DE 2017

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca Setorial do CCBS - UFCG

L732e

Lima, Fagner Arruda de.

Estudo da ação antifúngica de *erythroxyllum subrotundum* sobre cepas do gênero *candida* / Fagner Arruda de Lima. – Campina Grande, PB: O autor, 2017.

24 f.: il.Color. 21 x 27,9 cm.

Orientador: Cristina Ruan Ferreira de Araújo, Dra.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Enfermagem) – Universidade Federal de Campina Grande, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Candida. 2.Plantas Medicinais. 3.Fitoterapia. 4.Erythroxyllum. I. Araújo, Cristina Ruan Ferreira de. (Orientadora). II. Título.

BSTBS/CCBS/UFCG

CDU 616-083:615.322 (813.3)



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE - UFCG
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - UACS
CURSO DE ENFERMAGEM

ATA DA DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO - TCC DO CURSO DE
ENFERMAGEM, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE - CAMPUS DE
CAMPINA GRANDE - PB.

Aos 28 dias do mês de Março do ano 2017 às 16:15 horas, na sala 06, com a presença dos professores participantes da banca examinadora abaixo discriminada, realizou-se a defesa do Trabalho de Conclusão de Curso, intitulado ESTUDO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DE ERYTHROXYLUM SUBROUNDUM SOBRE CEPAS DO GÊNERO CANDIDA, desenvolvido pelo aluno (a) FACONER ARAÚJO DE LIMA, regularmente matriculado no componente curricular TCC II, no semestre 2016.2, orientado pelo professor (a) CRISTINA RUIAN FERREIRA DE ARAÚJO. O período da defesa transcorreu em conformidade com as normas estabelecidas pelo regimento do TCC. O aluno utilizou 20 minutos para a apresentação do seu TCC. Ao término da defesa o (a) aluno (a) juntamente com o público retirou-se da sala e a banca a portas fechadas emitiu o parecer, atribuindo a nota ao aluno. Em seguida o aluno foi reconduzido à sala e o resultado da sua avaliação foi divulgado pelo orientador. Obtendo nota 5,4 (cinco, quatro) pelos examinadores. O orientador agradeceu a presença de todos. Assim, dou fé.

Campina Grande, 28/03/2017

ORIENTADOR (A): CRISTINA RUIAN FERREIRA DE ARAÚJO
TITULAÇÃO: Doutora

BANCA EXAMINADORA:

1º Membro: Francineide P. Silva Titulação: Mestre
2º Membro: [Assinatura] Titulação: Doutora

Curso de Bacharelado em Enfermagem

Coordenação do TCC II

FAGNER ARRUDA DE LIMA

**ESTUDO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DE *Erythroxyllum subrotundum* SOBRE CEPAS
DO GÊNERO *Candida***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Enfermagem da UFCG/CCBS
como requisito para a conclusão do
componente curricular TCC II.

APROVADO EM: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Cristina Ruan Ferreira de Araújo (UFCG/CCBS)

Prof.^a Ms. Sheila Milena Pessoa Dos Santos Fernandes (UFCG/CCBS)

Prof. Dr. Saulo Rios Mariz (UFCG/CCBS)

AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, por me segurar e manter firme por tantas vezes que pensei em desistir e por está sempre ao meu lado. Obrigado Senhor por tudo.

A minha Tia: **Rita**, a minha mãe: **Neta** e ao meu Pai: **Francisco**, por terem feito o possível e o impossível para que eu estivesse onde estou, pelo exemplo de seres humanos, nos quais me espelho e tenho orgulho de tê-los como pais.

A hoje amiga e minha eterna professora: Dr^a **Cristina Ruan**, pela compreensão, pela grande paciência, pela confiança e pela valiosa orientação. Obrigado, pela força, pelos puxões de orelha, por tudo que me ensinou e pelo que fez e faz por mim.

Aos Professores **Sheila Milena** e **Saulo Rios** que participaram da avaliação do trabalho e aceitaram prontamente participar da banca avaliadora.

Aos meus amigos: **Adailton Henriques**, **Alison Oliveira**, **Edgley Duarte**, **Edney Guerra**, **Gabriel Vasconcelos**, **Gutemberg Santiago** e **Lucas Lino** que foram companheiros de vida, de viagens, de histórias e sempre me apoiaram, me deram auxílio, com sentimentos, gestos, palavras e pensamentos. Sendo sempre presentes nas horas em que mais precisei: seja pra brindar, seja pra rir, pra abraçar, ou apenas compartilhar um silêncio.

A minha amiga e colega de classe **Karyanna Rocha**, por está sempre por perto para compartilhar as felicidades e também as angústias, por dividir por várias vezes o peso das dificuldades e a leveza das vitórias, pela amizade, confiança e por me mostrar que as dificuldades representam o maior incentivo para conquistar o que você quer.

Aos meus familiares: **Irmãos**, **Avós**, **Avôs**, **Tias**, **Tios**, **Primas** e **Primos** pelo apoio que foi me dado por esses quase 6 anos de graduação.

As(os) minhas(meus) **Professoras(es) do curso de Enfermagem - UFCG**, que contribuíram grandemente com a minha formação profissional e pessoal durante esse período de graduação, muitos são exemplos dos profissionais que quero ser.

A coordenadora do Laboratório de Microbiologia CCBS – UFCG, Prof. Dr^a **Mabel Calina Paz** pelos ensinamentos, incentivo e paciência.

Aos amigos e colegas do **grupo PET – Fitoterapia**, por todo o apoio e compreensão que tiveram na minha estada nesse programa.

As minhas **Preceptoras** no estágio supervisionado I e II por toda a paciência e conhecimentos a mim dispendido.

Agradeço ainda, aos **Desconhecidos** que me apoiaram em determinado período da vida acadêmica até mesmo com um sorriso ou um “bom dia” ou ainda os que não se dispuseram a ajudar, saibam que de uma forma ou de outra contribuíram com minha formação.

“In his omnibus supervincimus per eum, qui Dilexit nos”.

(Rm 8,37)

RESUMO

LIMA, Fagner Arruda. **ESTUDO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DE *Erythroxylum subrotundum* SOBRE CEPAS DO GÊNERO *Candida***. 2017. p. Monografia (Manuscrito). Unidade Acadêmica de Enfermagem. Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande. 2017.

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas em muitas culturas ao longo de milhares de anos e informações sobre o uso das fontes naturais possuem um papel crucial na descoberta de novos produtos desenvolvidos a partir de plantas como agentes quimioterápicos. As plantas fizeram e fazem parte da vida do homem desde os primórdios da humanidade se inserindo também no âmbito acadêmico onde é histórica a convicção das potencialidades do uso de espécies vegetais para o desenvolvimento de novos medicamentos. As espécies do gênero *Erythroxylum* são utilizadas na medicina popular para o tratamento de infecções bacterianas e virais da pele, amenorreia, hemorragias, infecções renais e respiratórias. Além disso, a planta também apresenta utilização como fungicida. Diante do restrito espectro de antifúngicos presente atualmente no mercado, quando comparado à larga escala de drogas antibacterianas, e do problema cada vez mais comum de resistência dos microrganismos aos fármacos, alternativas têm sido buscadas para o desenvolvimento de novas drogas. Dessa forma o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica *in vitro* da *Erythroxylum subrotundum* sobre cepas de *Candida sp.*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. utilizando a técnica de microdiluição.

Descritores: *Candida*; Plantas Medicinais; Fitoterapia; *Erythroxylum*.

ABSTRACT

LIMA, Fagner Arruda. **STUDY OF THE ANTIFUNGAL ACTION OF *Erythroxyllum subrotundum* ON STRAINS OF THE GENDER *Candida***. 2017. p. Monograph (Manuscript). Nursing Academic Unit. Federal University of Campina Grande, Campina Grande. 2017.

Medicinal plants have been used in many cultures over thousands of years and information on the use of natural sources plays a crucial role in the discovery of new products developed from plants as chemotherapeutic agents. The plants have made and are part of the life of man since the beginning of mankind and also inserted in the academic scope where it is historical the conviction of the potentialities of the use of plant species for the development of new medicines. Species of the genus *Erythroxyllum* are used in folk medicine for the treatment of bacterial and viral infections of the skin, amenorrhea, hemorrhages, renal and respiratory infections. In addition, the plant also has use as a fungicide. In view of the limited spectrum of antifungal agents currently present in the market, when compared to the large scale of antibacterial drugs, and the increasingly common problem of resistance of microorganisms to drugs, alternatives have been sought for the development of new drugs. Thus the present study aimed to evaluate the in vitro antifungal activity of *Erythroxyllum subrotundum* on strains of *Candida* sp., *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* and *C. krusei*. Using the microdilution technique.

Keywords: *Candida*; Medicinal plants; Phytotherapy; *Erythroxyllum*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração Fungicida Mínima (CFM) e Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato *Erythroxyllum subrotundum* em diferentes concentrações frente a cepas do gênero *Candida*. 20

Tabela 2. Concentração Fungicida Mínima (CFM) e Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Fluconazol em diferentes concentrações frente a cepas do gênero *Candida*. 20

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Plaqueamento da coluna 7 - Microdiluição do extrato de *Erythroxyllum subrotundum* sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 2091. 21
- Figura 2.** Plaqueamento da coluna 8 - Microdiluição do extrato de *Erythroxyllum subrotundum* sobre cepas de *Candida glabrata* ATCC 2001. 21
- Figura 3.** Plaqueamento da coluna 8 - Microdiluição do extrato de *Erythroxyllum subrotundum* sobre cepas de *Candida Krusei* ATCC 34135. 22
- Figura 4.** Plaqueamento da coluna 7 - Microdiluição do extrato de *Erythroxyllum subrotundum* sobre cepas de *Candida sp* ATCC 34147. 22
- Figura 5.** Plaqueamento da coluna 6 - Microdiluição do extrato de *Erythroxyllum subrotundum* sobre cepas de *Candida tropicalis* ATCC 28707. 23

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVOS.....	13
	2.1 Objetivo geral.....	13
	2.2 Objetivos específicos.....	13
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
4	MÉTODOLOGIA	17
	4.1 Desenho do Estudo.....	17
	4.2 Material Botânico.....	17
	4.3 Preparo do extrato de <i>Erythroxylum subrotundum</i>	17
	4.4 Espécies fúngicas.....	18
	4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	18
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	24
	REFERÊNCIAS	24

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas em muitas culturas ao longo de milhares de anos e informações sobre o uso das fontes naturais possuem um papel crucial na descoberta de novos produtos desenvolvidos a partir de plantas como agentes quimioterápicos. A vegetação presente na caatinga e cerrado brasileiros constitui-se como um bioma em extinção, pois vem sofrendo a ação antrópica há muitas décadas, resultando na conversão de extensas áreas arbustivas em terras para pastagem e colheita. Muitas dessas espécies de plantas presentes na caatinga e no cerrado são amplamente conhecidas por sua utilização na medicina popular e na produção comercial de produtos fitoterápicos (SILVA et al, 2012).

No âmbito acadêmico é histórica a convicção das potencialidades do uso de espécies vegetais para o desenvolvimento de novos medicamentos. As plantas fizeram e fazem parte da vida do homem desde os primórdios da humanidade sendo inegável sua importância nos diversos estágios evolutivos da civilização (SIMÕES; SCHENKEL, 2002).

A família Erythroxylaceae comporta cerca de 240 espécies divididas em quatro gêneros: *Aneulophus* Benth., *Erythroxylum* P. Browne, *Nectaropetalum* Engl. e *Pinacopodium* Exell & Mendonça. No Brasil são encontradas mais de cem espécies com prevalência na Mata Atlântica e destaque para a região nordeste (COSTA-LIMA; LOIOLA; JARDIM, 2014, GONZÁLEZ-GUEVARA et al., 2005).

As espécies do gênero *Erythroxylum* são utilizadas na medicina popular para o tratamento de infecções bacterianas e virais da pele, amenorreia, hemorragias, infecções renais e respiratórias. Além disso, algumas espécies também apresenta utilização como fungicida (BARBOSA et. al., 2014; ARAUJO et al., 2012; SILVA et al., 2001, RODEIRO, et al., 2008).

As espécies de *Candida* residem na microbiota dos humanos como microorganismos comensais, habitando primariamente o trato gastrointestinal, além de fazer parte também da microbiota vaginal, da uretra e dos pulmões. Vivem sob um delicado balanço com o hospedeiro, e quando nele ocorre um desequilíbrio da homeostase ou quando há uma depressão do seu sistema imune, o fungo pode vir a tornar-se parasita, causando patologias neste hospedeiro, motivo pelo qual é considerada uma espécie oportunista (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; ÁLVARES et al, 2007).

Diante do restrito espectro de antifúngicos presente atualmente no mercado, quando comparado à larga escala de drogas antibacterianas, e do problema cada vez mais comum de resistência dos microrganismos aos fármacos, alternativas têm sido buscadas para o desenvolvimento de novas drogas. O emprego da *Erythroxyllum subrotundum* e a pesquisa por novas aplicações têm aumentado exponencialmente em diversas áreas, inclusive na indústria farmacêutica, devido às suas propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* da *Erythroxyllum subrotundum* sobre cepas de *Candida sp.*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*.

2.2 objetivos específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da *Erythroxyllum subrotundum* sobre cepas de *Candida sp.*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*.
- Determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM) da *Erythroxyllum subrotundum* sobre cepas de *Candida sp.*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Ao longo dos séculos, os seres humanos têm recorrido à natureza para suas necessidades básicas como a produção de alimentos, abrigos, roupas e medicamentos. As plantas formaram a base de sistemas de medicina tradicional que existem há milhares de anos.

Os produtos de origem natural são a fonte mais promissora de novas moléculas biologicamente ativas. Estas substâncias apresentam uma diversidade única de estruturas em comparação com aquelas desenvolvidas pela química combinatória em laboratórios. Menos de 10% da biodiversidade mundial foi testada com intuito de avaliar seu potencial biológico e muitos outros compostos aguardam por serem descobertos, sendo um desafio o modo de acesso a essa diversidade química (CRAGG, NEWMAN, 2005; DIAS, URBAN, ROESSNER, 2012).

O gênero *Erythroxylum* está amplamente presente nos continentes enquanto os demais encontram-se restritos à África, sendo seus principais centros de endemia o Brasil e a Venezuela. No Brasil são encontradas mais de cem espécies com prevalência na Mata Atlântica com destaque para a região nordeste (COSTA-LIMA, LOIOLA, JARDIM, 2014; GONZÁLEZ-GUEVARA et al, 2005).

Encontram-se presentes em espécies do gênero *Erythroxylum* alcaloides tropicais, como a cocaína produzida pela *Erythroxylum coca*, sendo esta a primeira subespécie do gênero estudada. Após esta descoberta o interesse científico se intensificou devido ao potencial terapêutico dos compostos encontrados. As espécies do gênero *Erythroxylum* são utilizadas na medicina popular para o tratamento de infecções bacterianas e virais da pele, amenorreia, hemorragias, infecções renais e respiratórias. Essa espécie apresenta alto potencial antioxidante, sendo os valores mais significativos encontrados na fração hexânica do extrato. Embora a espécie seja endêmica no país é pouco explorada terapeuticamente (BARBOSA et. al, 2014; ARAUJO, et al, 2012; SILVA, et al, 2001; RODEIRO et al, 2008).

A *Candida* é um gênero de fungo presente na microbiota dos seres humanos, principalmente no trato gastrointestinal, na microbiota vaginal, da uretra e dos pulmões. Caso ocorra um desequilíbrio em sua relação com o hospedeiro, essas leveduras podem se tornam patogênicas, sendo assim consideradas oportunistas. Esta transformação pode ser devida a comprometimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro (extremos de idade, doenças de base, imunossupressão) ou rompimento das barreiras anatômicas, tais quais queimaduras, cateteres ou cirurgias invasivas (CHIEN, 2013; GIOLO;SVIDZINSKI, 2010).

Nos últimos anos, infecções fúngicas se tornaram a principal causa de infecções nosocomiais, responsáveis por doenças desde a superfície mucosa até distúrbios sistêmicos (CHIEN, 2013). O gênero *Candida* é responsável por 8-10% de todas as infecções oportunistas e por 80% dos casos de infecções fúngicas sistêmicas. As infecções causadas por leveduras do gênero *Candida* são denominadas candidíase ou candidose e são um grave problema de saúde pública nas regiões subdesenvolvidas, apesar de afetarem significativamente também os países desenvolvidos. As complicações clínicas dessa doença são graves, refletindo em altas taxas de morbimortalidade que encontram-se na faixa de 40% a 60% (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; MACÊDO et al, 2009).

As micoses causadas por esses fungos apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas, podendo ser classificadas desde superficiais, com acometimento cutâneo e mucoso, até infecções profundas, disseminadas e de alta gravidade. As condições ideais de crescimento para esses microrganismos são superfícies quentes e úmidas (ÁLVARES et al, 2007; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

De acordo com Colombo (2003), o principal mecanismo de transmissão da candidemia é por via endógena. Outro mecanismo para transmissão é por via exógena, a qual ocorre principalmente por meio das mãos dos profissionais da saúde que cuidam dos pacientes e por materiais médico-hospitalares, tais como cateteres e soluções intravenosas contaminadas com fungos.

Devido à sua alta capacidade adaptativa, as leveduras da *Candida* podem se desenvolver tanto na presença de oxigênio, por vias aeróbias, quanto em anaerobiose. Na maioria das vezes se reproduzem de maneira assexuada, por meio de estruturas denominadas conídios. Contudo, algumas espécies se multiplicam sexualmente (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Candida spp. são classificadas taxonomicamente no reino *Fungi*, divisão *Eumycota*, subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Blastomycetes*, família *Cryptococcaceae*. Segundo Sidrim e Rocha, o gênero *Candida*, constituído de aproximadamente 200 espécies, é o principal entre as leveduras patogênicas e possui na *C. albicans* sua levedura mais prevalente. Entretanto, nas últimas décadas, notou-se um aumento significativo de outras espécies, conhecidas como não-*albicans*, cada vez mais envolvidas em processos infecciosos humanos: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. norvegensis*, *C. rugosa*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. ciferrii*, *C. haemulonii*, *C. lipolytica*, *C. pulcherrima*, *C. catenulata*, *C. utilis*, *C. viswanathii* e *C. zeylanoides* (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; ÁLVARES et al, 2007).

Dentre as diversas espécies de *Candida*, a *C. albicans* apresenta maior relevância em função da sua alta taxa de prevalência, tanto em condições normais, quanto em condições de patogenia. É um fungo dimórfico, que se apresenta sob formas leveduriformes (blastoconídios) no estado saprofítico, sendo, geralmente, uma colonização assintomática; ou como formas filamentosas (pseudo-hifas e hifas verdadeiras), vistas em processos patogênicos (ÁLVARES et al, 2007).

É consenso que esses microrganismos não são meros participantes passivos no processo infeccioso: eles participam ativamente do processo fisiopatogênico da doença utilizando-se de mecanismos de agressão denominados fatores de virulência (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; ÁLVARES et al, 2007). De acordo com Calderoni e Fonzi (2001), os principais fatores de virulência das leveduras são: capacidade de expressão de enzimas extracelulares, fosfolipases e proteinases, produção de substâncias tóxicas, capacidade de adesão a células e tecidos, formação de biofilmes sobre células e superfícies inanimadas, produção de tubo germinativo (apenas em algumas espécies de *Candida*), produção de hemolisinas, hidrofobicidade da superfície celular e resistência ao peróxido de hidrogênio.

Um estudo prospectivo realizado por Galván e Mariscal (2006) com 341 pacientes em 14 hospitais na Europa, mostrou que *Candida spp.* é responsável por números entre 25% e 50% das infecções em internos na área de cuidados intensivos, locais esses em que os pacientes são mais susceptíveis a infecções, devido ao quadro clínico.

No Brasil, resultados semelhantes foram encontrados. No estudo de Colombo et al (2003), realizado em 11 hospitais terciários. Foram confirmados 712 casos de candidíase sistêmica. *Candida spp.* foi também o quarto patógeno mais frequentemente isolado, precedido por estafilococos coagulase-negativa (ECN), *S. aureus* e *Klebsiella pneumoniae*.

Com relação à distribuição por espécies, de acordo com Colombo (2003), *C. albicans* foi a fungemia mais isolada até a década de 1990. Após este período foi observado um aumento na proporção de espécies não-*albicans*.

O atual arsenal de antifúngicos disponíveis no comércio é restrito, apesar do crescimento que os compostos farmacêuticos tiveram nos últimos tempos. Esta quantidade torna-se ainda menor quando comparada às drogas antibacterianas presentes no mercado. Outro fator que influencia negativamente nesta questão farmacêutica é a resistência que alguns microrganismos estão desenvolvendo nestes últimos anos a alguns agentes antifúngicos, o que gera preocupações acerca do caráter eucariótico da *Candida*, que é semelhante às células do hospedeiro, e acerca do menor número de drogas antifúngicas quando comparado aos antibióticos. Assim, *Erythroxyllum subrotundum*, com seu potencial antimicrobiano, além de anti-inflamatório, seriam uma alternativa viável e acessível para a produção de drogas inibitórias de fungos (GIOLO, SVIDZINSKI, 2010; CALAMARI et al, 2011).

Contudo, não são abundantes na literatura os estudos sobre os mecanismos da *Erythroxylum subrotundum* e a ação antifúngica sobre cepas de *Candida*. Faz-se, portanto, necessária uma maior exploração deste tema através da sua abordagem em projetos científicos, que possam detalhar a ação desses vegetais. Assim, o presente estudo se propõe a avaliar ação do extrato de *E. subrotundum* e sua ação sobre a *Candida*.

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho do Estudo:

Trata-se de em um estudo do tipo experimental. Os ensaios laboratoriais da atividade antifúngica dos extratos da planta pesquisada, foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

4.2 Material Botânico:

O material botânico foi obtido na região do Pico do Jabre no estado da Paraíba.

4.3 Preparo do extrato de *Erythroxylum subrotundum*:

O material botânico foi à lavagem, imerso em solução de hipoclorito de sódio 0,01%, promovendo-se dessa forma sua desinfecção. Após este procedimento, foram realizados procedimentos de secagem, os quais foram executados conforme Cordeiro et al (2006).

As partes da planta utilizadas nos experimentos foram as folhas. Estas foram expostas à temperatura ambiente sobre bancadas higienizadas, após ter sido feito previamente a antissepsia das mesmas. Em seguida, pesadas, e colocadas em estufa de circulação de ar, a 45°C; a cada 24 horas sendo pesadas até a estabilização da umidade. Após este processo, as folhas foram colocadas em um moinho de facas da marca “Solab Científica” e em seguida peneiradas no tamis de 10 mash para uma padronização granulométrica.

O extrato etanólico foi preparado das folhas e submetidas à maceração durante 15 dias em solução hidroetanólica a 70%, nas proporções de 1:6 e 1:2,3 p/v, respectivamente (OLIVEIRA, R. A. G., et al., 2006).

4.4 Espécies fúngicas:

Foram utilizadas na pesquisa cepas fúngicas padronizadas de *Candida sp* ATCC 34147, *Candida albicans* ATCC 2091; CBS 2730; NCYC 854, *Candida tropicalis* ATCC 28707, *Candida Krusei* ATCC 34135, *Candida glabrata* ATCC 2001, CBS 138, obtidas mediante solicitação ao departamento de microbiologia (laboratório de materiais de referência) da Fundação Oswaldo Cruz, remetidas liofilizadas, e posteriormente reativadas no Laboratório de microbiologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Campina Grande.

4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana:

Foi avaliada a atividade antifúngica *in vitro* da *Erythroxyllum subrotundum* sobre cepas de *Candida sp.*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* utilizando a técnica de microdiluição.

Preparação da Suspensão Microbiana:

Inóculo Microbiano: O preparo do inóculo se deu de forma que quando inserido no poço da microplaca resulte em 5×10^5 Unidade de Formação de Colônias (UFC)/mL. Para o preparo do inóculo retirou-se 50µL da levedura que estará congelada com glicerol 20% e reativada em 5mL de Sabouraud, deixando por 18 horas na estufa 5% CO₂. Após 18 horas, removeu-se o equivalente a uma alça de platina desse caldo de levedura para plaquear em Sabouraud ágar, de modo a observar ao final de 24 horas de incubação. A partir da placa de Sabouraud, foram subtraídas 5-10 colônias isoladas e colocadas em 10mL de Sabouraud, levando novamente para estufa (5% CO₂) por 18 horas. Passado o período, coletou-se uma alíquota de aproximadamente 300 µL e a adicionado em 4mL de Sabouraud. Logo após passou pelo espectrofotômetro com comprimento de onda 525nm, para obtenção de uma absorbância 0,08-0,1 onde apresentou uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Passado pelas diluições seriadas encontrou-se um inóculo com $1,0 \times 10^6$ UFC/mL.

Solução controle: Foi utilizado o Fluconazol.

Microdiluição:

A técnica da microdiluição é uma adaptação da macrodiluição em caldo. É denominada desta maneira porque envolve o uso de pequenos volumes de caldo colocados em placas estéreis de 80, 96 ou mais poços de fundo redondo ou chato, próprias para microdiluição (ALVES et al., 2008).

Foram utilizadas microplacas contendo 96 orifícios com fundo em forma de “U”, distribuídos em colunas enumeradas de 1 a 12 e linhas em letras de “A” a “H”, no intuito submeter-se ao teste de microdiluição em caldo usando os documentos M27-A2 propostos pelo (CLSI, 2008).

Após o período de incubação, foram colocados 10 µL das todas as cavidades da microplaca em placa de *Petri*, as quais foram novamente incubadas a 37°C em estufa bacteriológica por 24 horas. A placa onde estava incubada a menor concentração de *E. subrotundum* e não houve crescimento algum será considerada CFM.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, observamos que a *Erythroxyllum subrotundum* tem um potencial antifúngico para espécies de *Cândida*, que merece atenção. A atividade inibitória/antifúngica do extrato contra espécies padrão de *Candida* (Tabela 1). O extrato apresentou atividade inibidora/fungicida variável a cada uma das cepas de *Cândidas* do tipo *Candida sp.*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*.

Diferentes resultados foram obtidos para as 05 espécies estudadas para atividade antifúngica contra as leveduras. O extrato de *E. subrotundum* apresentou atividade contra a espécie *C. tropicalis*: 250 µg / ml. As espécies: *Candida sp.*, *C. albicans* e *C. glabrata* apresentaram resposta na concentração de : 1000 µg / ml. Sendo então a resposta contra *C. krusei* a menor em comparação as outras espécies do estudo: 2000 µg / ml (Tabela 1).

Dessa forma, de acordo com as considerações de Holtz et al. (2002) que aceitou que os extratos apresentaram uma CFM menor que 100 µg / ml, uma boa atividade antimicrobiana; De 100 a 500 µg / ml do a atividade antimicrobiana foi moderada; De 500 a 1000 µg /ml, a atividade antimicrobiana foi fraca. Em relação ao nosso estudo 04 espécies tiveram atividade antimicrobiana

fraca: (*Candida sp.*, *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*), e 01 apresentou atividade antimicrobiana moderada: (*C. tropicalis*).

A Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi representada pela menor concentração capaz de impedir o crescimento fúngico, tendo sido determinada pela observação do crescimento do microrganismo em placas de *Petri*. Dessa forma, a concentração Inibitória Mínima (CIM) foi considerada igual a CFM.

De acordo com o que pode ser observado na tabela 2, não houve nenhuma espécie de *Cândida* em que o extrato e o Fluconazol apresentaram mesmos valores de CIM e CFM, a concentração inibitória/antifúngica do fluconazol foi sempre acima da apresentada pelo extrato.

Tabela 1. Concentração Fungicida Mínima (CFM) e Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato *Erythroxyllum subrotundum* em diferentes concentrações frente a cepas do gênero *Candida*.

	Concentrações (µg/ml)					
	20000	1000	500	250	125	62,5
<i>Candida sp</i>	-	-	+	+	+	+
<i>C. albicans</i>	-	-	+	+	+	+
<i>C. glabrata</i>	-	-	+	+	+	+
<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	-	+	+
<i>C. krusei</i>	-	+	+	+	+	+

* (-) sem crescimento visível **(+) crescimento visível

Tabela 2. Concentração Fungicida Mínima (CFM) e Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Fluconazol em diferentes concentrações frente a cepas do gênero *Candida*.

	Concentrações (µg/ml)					
	20000	1000	500	250	125	62,5
<i>Candida sp</i>	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i>	-	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>C. krusei</i>	-	-	-	-	-	-

* (-) sem crescimento visível **(+) crescimento visível

Nas colunas 1, 2 e 9 de todas as microplacas, a ausência de crescimento fúngico era esperado, uma vez que representavam o controle do meio, do extrato e controle com medicamento fungicida de 1ª escolha, respectivamente. Nas colunas 3 e 4 era esperado o crescimento fúngico pois representavam o controle do inóculo e o controle negativo do

diluíente do extrato. As colunas 6, 7 e 8 continham: meio, inóculo fúngico, e a microdiluição do extrato, foi observado crescimento do microrganismo, em concentrações variadas a depender da espécie fúngica testada. Indicando dessa forma, ação inibitória/fungicida do extrato utilizado (Figura 1,2,3,4 e 5).

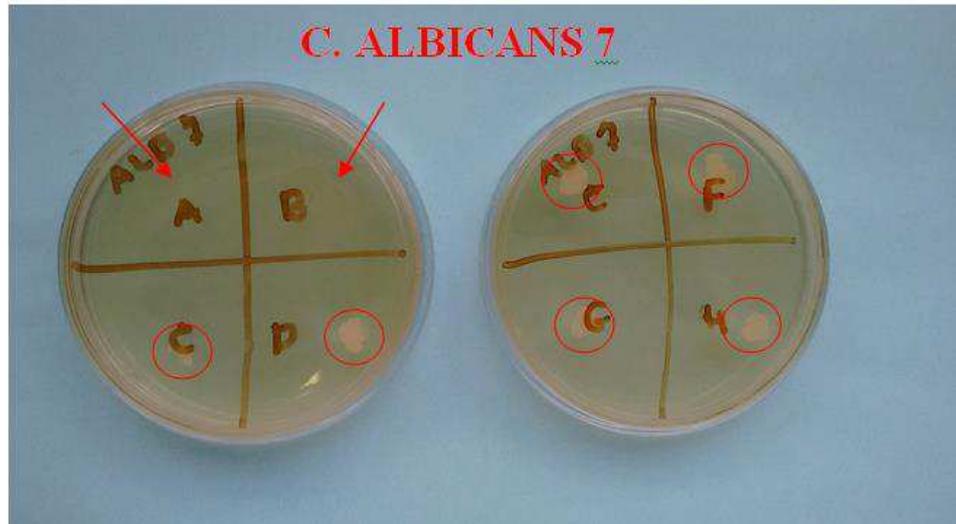


Figura 1. Plaqueamento da coluna 7 - Microdiluição do extrato de *Erythroxylum subrotundum* sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 2091.

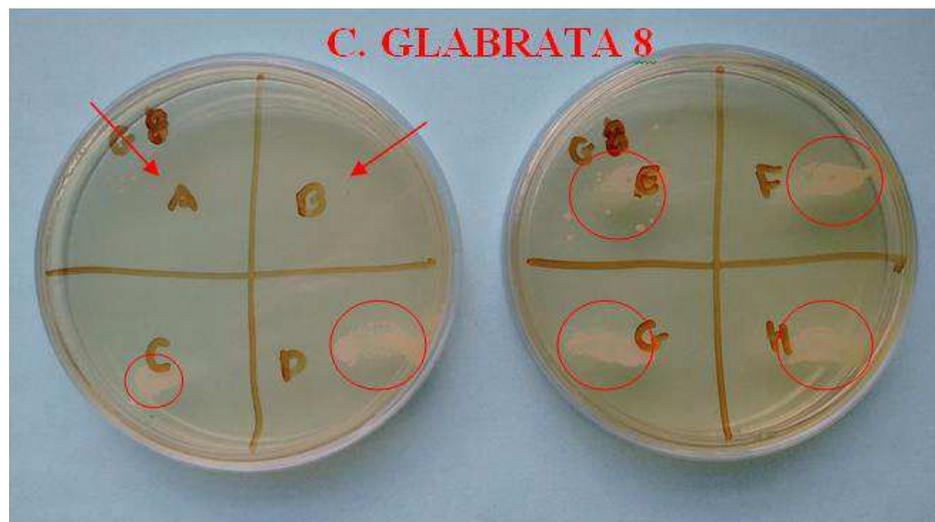


Figura 2. Plaqueamento da coluna 8 - Microdiluição do extrato de *Erythroxylum subrotundum* sobre cepas de *Candida glabrata* ATCC 2001.

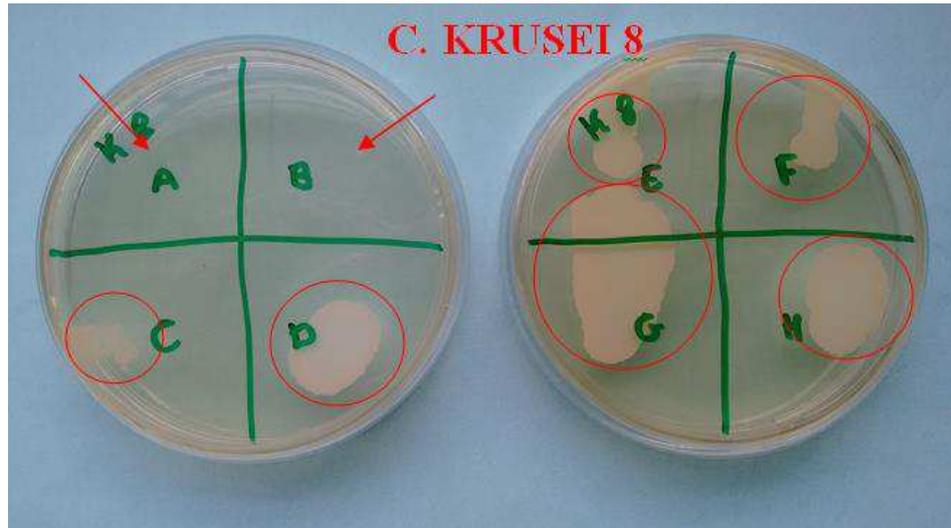


Figura 3. Plaqueamento da coluna 8 - Microdiluição do extrato de *Erythroxyllum subtrotundum* sobre cepas de *Candida Krusei* ATCC 34135.

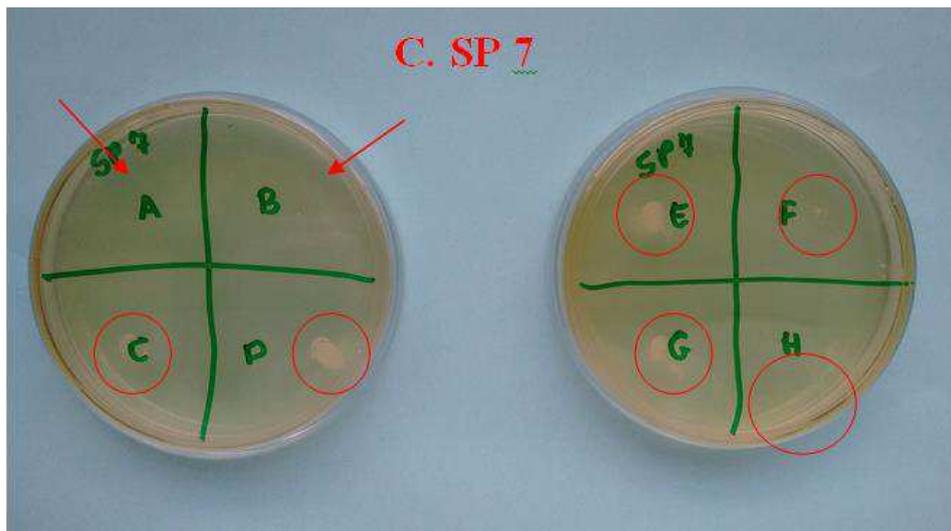


Figura 4. Plaqueamento da coluna 7 - Microdiluição do extrato de *Erythroxyllum subtrotundum* sobre cepas de *Candida sp* ATCC 34147.

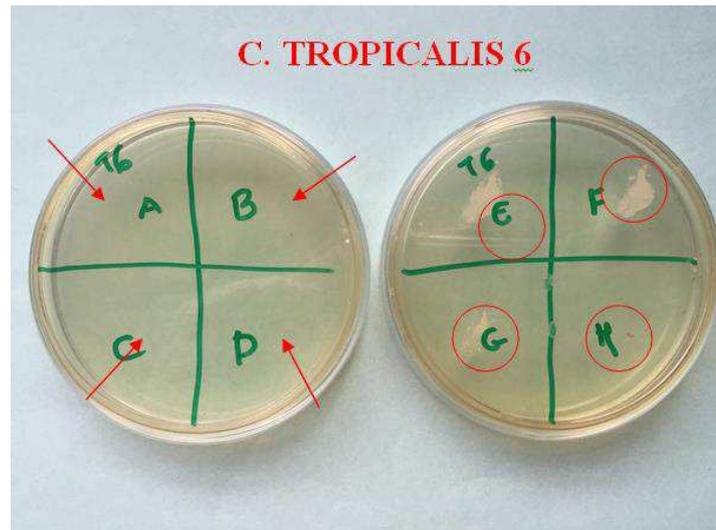


Figura 5. Plaqueamento da coluna 6 - Microdiluição do extrato de *Erythroxylum subrotundum* sobre cepas de *Candida tropicalis* ATCC 28707.

Pesquisas sobre o potencial antifúngico do extrato da *Erythroxylum subrotundum* são pouco encontrados na literatura, entretanto, podemos citar alguns estudos sobre a atividade biológica desta espécie, e de outras do mesmo gênero, em microrganismos de grande importância para a saúde do homem.

No estudo de Correia et al. (2016) o extrato etanólico de *Erythroxylum subrotundum* foi testado em diversos microrganismos advindos de isolados clínicos, entre eles duas espécies de cândida: *C. Glabrata* e *C. parapsilosis*. Sendo que resultados positivos foram apresentados para a ação inibitória/ antifúngica em *C. Glabrata*. Nesse mesmo estudo, o teste do extrato aquoso de *Erythroxylum subrotundum*, obteve como resultado a inibição de crescimento/atividade antifúngica de três espécies clínicas, sendo elas: *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*. Revelou ainda, atividade inibitória contra um isolado de *C. tropicalis*.

Estudos com espécies da família da *Erythroxylum*, também mostraram resultados promissores. Violante et al. (2012) testaram a atividade antimicrobiana e antifúngica de algumas espécies vegetais brasileiras, dentre elas a *Erythroxylum suberosum* St. Hil contra espécies de *Candida albicans* (ATCC 90028), *tropicalis* (ATCC 760), *glabrata* (ATCC 9030), *C. krusei* (ATCC 6258) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019). Utilizando extratos nas formas de: etanólico, hexânico, diclorometano, acetato de etila e hidrometanólico. Em todas as concentrações do extrato testadas foi observado inibição do crescimento de todas as espécies de microrganismos avaliados com diferentes valores de CIM. Os menores valores de CIM

foram observados nos testes sobre *C. krusei* (62,5µg/ml) e *Candida glabrata* (125µg/ml). Diante dos resultados os pesquisadores concluíram que dentre as espécies investigadas *Erythroxyllum suberosum* foi considerada entre as mais promissoras para o desenvolvimento de futuras investigações.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Entende-se então, que as espécies do gênero *Erythroxyllum* apresentam significativas potencialidades terapêuticas e um considerável espectro de ação sobre os microrganismos testados. Mostrando assim que a planta tem uma importante classe química com atividade antifúngica.

O estudo nos leva a afirmar que essa espécie deve ser melhor avaliada, quanto ao seu potencial inibitório e fungicida. Sendo considerado o número crescente de infecções por espécies de *Candida*, enfocando a sua importância para a saúde pública, novos estudos podem colaborar com a recomendação do uso da planta como opção para o tratamento alternativo ou complementar nas doenças fúngicas e contribuir na busca contínua de produtos naturais com atividade antifúngica.

REFERÊNCIAS

1. ÁLVARES, C.A.; SVIDZINSKI, T.I.E.; CONSOLARO, M.E.L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **J Bras Patol Med Lab**, v.43, n.5, p. 319-327, 2007.
2. ALVES, S.H.; CURY, A.E. Estudo comparativo entre as técnicas de diluição em caldo e diluição em ágar, nos antibiogramas para *Candida*. **Rev. Inst. Med. Trop**, São Paulo, v. 34, n.3, p. 259-262, 2008.
3. ARAUJO, L. D. C. Avaliação da atividade antioxidante in vitro e determinação de fenóis totais de espécies do gênero *Erythroxyllum*, *VII Reunião Regional da FeSBE – Regional 2012*.
4. BARBOSA, C.C. Aspectos gerais e propriedades farmacológicas do gênero *Erythroxyllum*, **Revista Saúde e Ciência (on line)**, v.3, n.3, p. 207-216, 2014.
5. CALAMARI, S.E. Antifungal and post-antifungal effects of chlorhexidine, fluconazole, chitosan and its combinations on *Candida albicans*. **Med Oral Patol Cir Bucal**, v.16, n.1, p.23-28, 2011.

6. CALDERONE, R. A. & FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends Microbiol.**, v. 9, 327-335, 2001.
7. CHIEN, H.-F. The use of chitosan to enhance photodynamic inactivation against *Candida albicans* and its drug-resistant clinical isolates. **Int. J. Mol. Sci.** n.14, p.7445-7456, 2013.
8. CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE: *Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15º Suplemento Informativo*, v. 25, n.1, 2008.
9. COLOMBO, A.L. **Contribuições para o entendimento da epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp.* e para sua abordagem terapêutica.** Tese para obtenção do título de livre-docência apresentada a Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, 2003.
10. CORDEIRO, C.H.G. et al. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 3, p.395-404, 2006.
11. CORREIA, A. F. et al. Activity of crude extracts from Brazilian cerrado plants against clinically relevant *Candida* species. **Complementary and Alternative Medicine** v. 16, n. 203, 2016.
12. COSTA-LIMA, J. L.; LOIOLA, M. I. B.; JARDIM, J. G. Erythroxyllaceae no Rio Grande do Norte. **Rodriguésia**. v. 65, n.3, p. 659 - 671, 2014.
13. CRAGG, M. G.; NEWMAN, D. J. Biodiversity: A continuing source of novel drug
CROCCO, Elisete I. et al. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica in vitro: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. **An. Bras. Dermatol.** V.79, n.6, p.689-697. 2004.
14. DIAS, D.A., URBAN, S., ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**. v.2, p. 303-336, 2012.
15. GALVÁN, B.; MARISCAL, F. Epidemiología de la candidemia en UCI. **Rev Iberoam Micol.** v.23, n.12,p.5, 2006.
16. GIOLO, M.P.; SVIDZINSKI, T.I.E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **J Bras Patol Med Lab**, v. 46, n.3, p. 225-234, 2010.
17. GONZÁLES-GUEVARA, J. L. et al. Flavonoid glycosides from Cuban Erythroxyllum species, *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 34, p. 539-542, 2006. leads, *Pure Appl. Chem.*, v. 77, n. 1, p. 7-24, 2005.
18. HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v.7, n.97,p.1027-31. 2002.

19. HUANG, S.-H.; JONG, A. Y. Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. *Cell Microbiol.* v.3, p.277–287, 1997.
20. MACÊDO, D.P.C. et al. Infecções oportunistas por leveduras e perfil enzimático dos agentes etiológicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.2, p.188-191, 2009.
21. OLIVEIRA, R. A. G. et al., Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Maringá, v. 16, n. 1, p. 77-82, 2006.
22. PALOMINO, J.C. et al., Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 46, p. 2720-2722. 2002.
23. RODEIRO, I. et al. Modulation of P450 enzymes by Cuban natural products rich in polyphenolic compounds in rat hepatocytes. *Chem Biol Interact.* v. 10, n. 172, v.1, p. 1-10, 2008.
24. SILVA, G. L., et al. Modulation of the multidrug-resistance phenotype by new tropane alkaloid aromatic esters from *Erythroxylum pervillei*. *J Nat Prod.* v. 64, n. 12, p. 1514-1520, 2001.
25. SILVA, M.I.G. et al. Bioactivity and potential therapeutic benefits of some medicinal plants from the Caatinga (semi-arid) vegetation of Northeast Brazil: a review of the literature. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 22, n., p. 193-207, 2012.
26. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n.1, p. 35-40, 2002.
27. VIOLANTE, I. M. P. et al. Antimicrobial activity of some medicinal plants from the cerrado of the central-western region of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1302-1308, 2012.