



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAIBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICAS ODONTOLÓGICAS
NÍVEL: MESTRADO

EVELINE ANGÉLICA LIRA DE SOUZA SALES ROCHA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA, CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E PERFIL
TÉRMICO DA *ANADENANTHERA COLUBRINA* (VELL.) BRENNAN**

CAMPINA GRANDE - PB

2014

EVELINE ANGÉLICA LIRA DE SOUZA SALES ROCHA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA, CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E PERFIL
TÉRMICO DA *Anadenanthera colubrina* (VELL.) BRENNAN**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Edja Maria Melo de Brito Costa

CAMPINA GRANDE - PB

2014

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

R672a Rocha, Eveline Angélica Lira de Souza Sales.
Atividade antifúngica, caracterização fitoquímica e perfil térmico da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan [manuscrito] / Eveline Angélica Lira de Souza Sales Rocha. - 2014.
81 p. : il. color.

Digitado.
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2014.

"Orientação: Profa. Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa, Departamento de Odontologia".

1. Plantas medicinais. 2. Ação Antimicrobiana. 3. *Candida albicans*. I. Título.

21. ed. CDD 615.321

EVELINE ANGÉLICA LIRA DE SOUZA SALES ROCHA

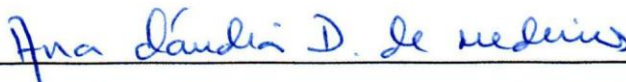
**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA, CITOTOXICIDADE, CARACTERIZAÇÃO
FITOQUÍMICA E PERFIL TÉRMICO DA *Anadenanthera colubrina* (VELL.)
BRENAN**

DATA DA DEFESA: 29/07/2014

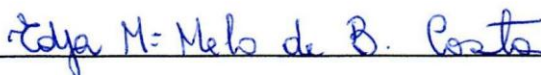
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos/UFRJ
Membro Titular (Examinador externo)



Prof. Dr. Ana Cláudia Dantas de Medeiros/UEPB
Membro Titular (Examinador interno)



Prof. Dr. Edja Maria Melo de Brito Costa/UEPB
Membro titular (Orientadora)

Dedico
Aos meus maiores exemplos de competência e
equilíbrio:
minha mãe Ângela Maria e meu esposo Francisco
Cordão.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus Todo Poderoso, Jeová, Criador da vida e provisor de tudo que é bom. Que me capacitou e me deu entendimento e sabedoria para realizar o que achei que não conseguiria com as minhas próprias forças, que me mostrou a cada dia, através da sua Palavra inspirada, o que realmente importa na vida.

À minha mãe, Ângela Maria, aquela em que me espelho todos os dias a fim de poder me tornar alguém semelhante, minha maior fã e incentivadora que apoiou e patrocinou todos os meus sonhos e sempre acreditou no meu potencial.

Ao meu amado e precioso esposo, Francisco Cordão, um verdadeiro presente em minha vida, que torna a caminhada leve e que deu um grande apoio emocional, espiritual, moral e científico em todas as etapas de consecução desse trabalho.

À minha amada família e amigos, em especial, minhas irmãs Mariângela e Cláudia que sempre estão ao meu lado e torcem pelo meu sucesso.

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Edja, que se tornou uma parceira nos desafios e conquistas. Sempre que necessário compreendeu, ouviu, questionou, exigiu, corrigiu e também reanimou. Nunca deixou de acreditar que faríamos boas coisas juntas e que colheríamos os frutos disso.

À professora Dra. Ana Cláudia, uma grande amiga que ganhei na graduação e que sempre me acompanha, ensina e encoraja. Com sua magistral arte de dirigir o Labdem, me deixou um grande exemplo para a profissional que pretendo ser um dia. Abriu as portas do laboratório, e com muita simplicidade e humildade, apesar de sua posição de autoridade, sempre esteve disponível e acessível.

À Coordenação do Mestrado nas pessoas dos professores Dra. Patrícia e Dr. Cassiano, as secretárias Márcia e Fabrícia, e aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB, Drs. Sérgio, Gustavo, Alessandro e Dras. Ana Flávia, Daliana, Daniela e Pollianna que contribuíram para a minha titulação.

Aos professores Dr. Ricardo Castro, Dra. Karina Saraiva, Dr. Bolívar Damasceno e Dr. Germano Vêras que contribuíram com seus ensinamentos e de maneira logística na realização desse trabalho.

Aos amigos queridos da turma de mestrado, Emmanuel, Julyanna, Janaína, Ianny, Kevan, Marayza, Monalisa, Rafaella, Patrícia e Thaíse, que tornaram essa experiência em minha vida mais rica. Por dois anos, tivemos uma excelente convivência, nos divertimos

muito uns com os outros e aprendemos ainda mais, e, certamente, fizemos a base para lindas e duradouras amizades.

Ao parceiro e amigo Ivison, um agradecimento especial por sua amizade, suas palavras sábias, pelas risadas, pelo encorajamento, pelas publicações, pelas viagens científicas e por acreditar mais do que eu mesma no meu potencial.

Aos amigos do Labdem Thiago, Elaine, Fernando, Monik, Lianne, Aline, Jocimar, René, Fernanda, Michele e em especial Deysiane, Cleildo, Felipe e Yuri que contribuíram na realização das análises laboratoriais da pesquisa de mestrado.

À técnica de laboratório Airla e à mestranda Luanne, que auxiliaram de maneira logística nas várias etapas dos trabalhos realizados.

Ao Centro de Tecnologia Estratégias do Nordeste, nas pessoas de Gabriela, Dyego e Fábria pela análise em Microscopia Eletrônica de Varredura.

Às colaboradoras de Iniciação Científica Larissa, Cibelle, Priscila e Carol à mestranda Érika pela disposição de ajudar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos de Mestrado que permitiu uma maior dedicação às atividades laboratoriais.

*“Dá ao sábio e ele se tornará ainda mais
sábio. Transmite conhecimento a alguém
justo e ele aumentará em erudição”
(Provérbios 9:9)*

Rocha, E. A. L. S. S. Atividade antifúngica, caracterização fitoquímica e perfil térmico da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan [Dissertação de Mestrado]. Campina Grande: Universidade Estadual da Paraíba; 2014.

RESUMO

Existe uma grande demanda por novos antifúngicos de diferentes classes estruturais, agindo seletivamente sobre novos alvos celulares, com menos efeitos colaterais, nesse sentido as plantas medicinais são excelentes fontes para obtenção de uma grande variedade de drogas. Objetivou-se investigar a atividade antifúngica do extrato vegetal de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, bem como caracterizá-lo fitoquimicamente e definir seu perfil térmico. Foram coletadas cascas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan na região do semiárido paraibano (7°22' 25" S, 35° 59' 32"W), obtido o extrato através de maceração, rotaevaporação e liofilização. Para a Determinação da Concentração Inibitória Mínima foi utilizada a técnica de Microdiluição em Caldo e os microrganismos *Candida albicans*, (ATCC 18804), *Candida krusei* (ATCC 34135), *Candida guilliermondii* (ATCC 6260), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida tropicalis* (ATCC 13803) e cepas clínicas recentemente isoladas de *Candida albicans* (LM 11, LM 70, LM 410). A Determinação da Concentração Fungicida Mínima foi realizada através de subcultivos em placas contendo ágar Sabouraud dextrose. A ação sobre a parede celular de *Candida albicans* foi investigada através da determinação da CIM do extrato vegetal na presença de sorbitol (0,8M), utilizando a técnica de microdiluição. Através de Microscopia Eletrônica de Varredura, avaliou-se a morfologia celular de *Candida albicans* tratada com a CIM do extrato vegetal, a CIM da suspensão de nistatina (100.000UI) e livre de tratamento. O efeito combinado das duas substâncias (nistatina e extrato vegetal de *Anadenanthera colubrina*) estudadas foi determinado a partir da técnica de microdiluição - checkerboard para derivação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (Índice CIF) e através do método de contagem de células viáveis (cinética do crescimento). Nessa última, foram analisadas as seguintes concentrações variadas do extrato, nistatina e associação dos produtos (CIM/8; CIM/4; CIM). Foram realizados os testes não paramétricos de Fridman e o teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$). Na prospecção fitoquímica, determinou-se o teor de polifenóis totais, de flavonoides totais e de taninos condensados através de espectrofotometria. O perfil térmico foi traçado com a determinação das curvas termograviméricas (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). A toxidez foi avaliada

através da quantificação de hemácias que sofrem lise celular frente à diferentes concentrações de extrato vegetal (0,25, 0,5, 1, 2, 4 mg/ml). Observou-se que a *A.colubrina* tem potencial fungistático frente todas as cepas padrão testadas, e, fungicida frente aos isolados clínicos recentes de *Candida albicans*. O aumento de 1mg/ml para 8mg/ml da CIM na presença de sorbitol sugere que esse extrato age modificando a parede celular do fungo. As imagens em MEV evidenciam a redução na quantidade de células fúngicas após o tratamento com o extrato vegetal e alterações na parede celular fúngica. O índice de FIC calculado foi de 0,375, indicando sinergismo entre a nistatina e o extrato vegetal. Na cinética, observou-se a manutenção do sinergismo entre os produtos testados ao longo do tempo ($p<0,05$). Foram determinados 53,18% de polifenóis totais, 8,73% de taninos condensados e 0,28% de flavonoides. A curva TG do extrato *A.colubrina*, mostrou a ocorrência de três etapas de decomposição térmica, a perda de massa mais significativa do extrato foi observada entre as temperaturas de 229,17°C e 657,39°C, com perda de 37,44%. As curvas DSC do extrato mostraram que os processos térmicos ocorreram no intervalo de temperatura entre 52,37 °C a 195,52°C. No teste de toxidez, nenhuma das concentrações testadas chegou a ser a concentração citotóxica efetiva 50% (EC50). Conclui-se que o extrato vegetal da casca de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan é um recurso promissor na obtenção de um novo fármaco para tratamento de candidose oral.

PALAVRAS-CHAVE: Plantas medicinais; Produtos com Ação Antimicrobiana, *Candida*.

ABSTRACT

There is a great demand for new antifungals of different structural classes, acting selectively on new cellular targets with fewer side effects, accordingly medicinal plants are excellent sources for obtaining a wide variety of drugs. This study aimed to investigate the antifungal activity of the plant extract *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan and fitoquimicamente characterize it and set its thermal profile. Shells *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan were collected in the semiarid Paraiba (7°22 '25 "S, 35 ° 59' 32" W), the extract obtained by maceration, using a rotary evaporator and freeze region. For the Determination of Minimum Inhibitory Concentration technique microdilution broth and microorganisms *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida krusei* (ATCC 34135), *Candida guilliermondii* (ATCC 6260), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida tropicalis* (ATCC 13803) and clinical strains was used recently isolated from *Candida albicans* (LM 11, LM 70, LM 410). The Determination of Minimum Fungicidal Concentration was performed by subculture on Sabouraud dextrose agar plates. The action on the cell wall of *Candida albicans* was investigated by determining the MIC of plant extract in the presence of sorbitol (0.8M), using the microdilution technique. Through scanning electron microscopy, we evaluated the cellular morphology of *Candida albicans* treated with the MIC of plant extract, the MIC of nystatin suspension (100,000 UI) and free treatment. The combined effect of the two substances (nystatin and vegetable extract *Anadenanthera colubrina*) studied was determined from the microdilution technique - checkerboard for derivation of Fractional Inhibitory Concentration Index (FIC Index) and by the method of counting viable cells (kinetics growth). In the latter, the following different concentrations of the extract and nystatin products association (CIM; CIM/4; CIM/8) were analyzed. Nonparametric tests Fridman and the Kruskal Wallis test ($p < 0.05$) were performed. In phytochemical screening, we determined the content of total polyphenols, total flavonoids and condensed tannins by spectrophotometry. The thermal profile was traced with the determination of termograviméricas curves (TG) and differential scanning calorimetry (DSC). The toxicity was assessed by quantitation of erythrocyte lysis suffering with different concentrations of plant extract (0.25, 0.5, 1, 2, 4 mg / ml). It was observed that the *A.colubrina* have fungistatic potential against all tested strains pattern, and fungicidal against recent clinical isolates of *Candida albicans*. An increase of 1 mg/ml to 8mg/ml of MIC in the presence of sorbitol suggests that this statement acts by modifying the fungal cell wall. The SEM images show the reduction in the amount of yeast cells after treatment with the plant extract and changes in the fungal cell wall. The FIC index was

calculated at 0.375, indicating synergism between the nystatin and the plant extract. Kinetics was observed maintaining the synergism between the products tested over time ($p < 0.05$). 53.18% of total polyphenols were determined, 8.73% from 0.28% condensed tannins and flavonoids. The TG curve *A.colubrina* extract showed the presence of three stages of thermal decomposition, the more significant weight loss was observed between the extract temperatures and 229,17°C 657,39°C with loss of 37.44%. The DSC curves of the extract showed that the thermal processes occur at temperatures between 52,37 °C to 195,5°C. In toxicity testing, none of the tested concentrations became effective cytotoxic concentration 50% (EC50). It is concluded that the plant extract from the bark of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan is a promising resource in getting a new drug for treatment of oral candidiasis.

KEYWORDS: Medicinal plants; Products with Antimicrobial Action, *Candida*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A.colubrina</i> (Vell.) Brenan	<i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan
ACAM	Herbário Manuel de Arruda Câmara
ATCC	American Type Culture Collection
CETENE	Centro de Tecnologia Estratégicas do Nordeste
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CSD	Caldo Sabouraud Dextrose
CYP	Citocromo P450
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
FIC	Índice de Concentração Inibitória Fracional
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
OMS	Organização Mundial de Saúde
TG	Termogravimetria
UFC	Unidades Formadoras de Colônia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma das etapas da metodologia realizada.....	25
Figura 2: Esquema para realização do ensaio para analisar o efeito interativo, pela técnica de checkerboard.....	29
Figura 3: Fotomicrografia, por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), de cepas de <i>Candida albicans</i> (ATCC 18804) tratadas com nistatina (suspensão 100.000UI), após 24 horas de incubação a 37°C.	45
Figura 4: Fotomicrografia, por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), de cepas de <i>Candida albicans</i> (ATCC 18804) tratadas com extrato vegetal da casca de <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan (1mg/ml), após 24 horas de incubação a 37°C.	45
Figura 5: Fotomicrografia, por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), de <i>Candida albicans</i> (ATCC 18804) sem tratamento, após 24 horas de incubação a 37°C.....	46
Figura 6: Microplaca da técnica de checkerboard após 24 horas de incubação a 37°C, evidenciando as menores concentrações das soluções combinadas capazes de inibir o crescimento fúngico: CIM/4 da nistatina + CIM/8 do extrato vegetal e CIM/8 da nistatina + CIM/4 do extrato vegetal.....	48
Figura 7: Cinética do crescimento de <i>C.albicans</i> (ATCC 18804) sob atividade dos produtos de teste em CIM.....	48
Figura 8: Cinética do crescimento de <i>C.albicans</i> (ATCC 18804) sob atividade dos produtos de teste em CIM÷4.	49
Figura 9: Cinética do crescimento de <i>C.albicans</i> (ATCC 18804) sob atividade dos produtos de teste em CIM÷8.	49
Figura 10: Curvas TG e DSC. Razão de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ . Temperaturas de 25 a 900 °C, para TG e de 25 a 400 °C para DSC.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do extrato hidroalcolólico da casca de <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan e da nistatina (Sigma-Aldrich®), contra espécies de <i>Candida</i>	43
Tabela 2: Determinação da Concentração Inibitória Mínima do extrato vegetal de <i>A.colubrina</i> frente à cepas de <i>Candida albicans</i> na presença e ausência de sorbitol.....	44
Tabela 3: Concentração Inibitória Mínima (CIM) (ug / ml) do extrato vegetal e nistatina isolados e combinados e Índice de Concentração Inibitória Fractional (FIC) contra <i>C.albicans</i>	47
Tabela 4: Caracterização fitoquímica quantitativa do extrato vegetal da casca da <i>A.colubrina</i>	50
Tabela 5: Leitura visual da hemólise das suspensões de hemácias testadas com extrato liofilizado de <i>Anadenanthera colubrina</i> Vell. Brenan. Utilizou-se como referência: – (0% de hemólise), +(25% de hemólise, ou abaixo de 25%), ++ (50% de hemólise), +++ (75% de hemólise).	53

SUMÁRIO

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	18
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo Geral	23
2.2. Objetivos Específicos	23
3. MATERIAL E MÉTODO	25
3.1. Material Vegetal	25
3.2. Obtenção do Extrato Vegetal	25
3.3. Atividade Antimicrobiana	26
3.3.1. Cepas microbianas	26
3.3.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	26
3.3.3. Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)	27
3.3.4. Ação do extrato vegetal de <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan sob a parede celular de <i>Candida albicans</i>	27
3.3.5. Análise da Morfologia Celular	28
3.3.6. Análise do efeito interativo	28
3.3.6.1. Método checkerboard	28
3.3.6.2. Cinética do crescimento/morte celular	29
3.4. Prospeção Fitoquímica	30
3.4.1. Determinação do teor de polifenóis totais	30
3.4.2. Determinação do teor de flavonoides	30
3.4.3. Determinação do teor de taninos condensados	31
3.5. Perfil térmico	31
3.5.1. Termogravimetria (TG)	31
3.5.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	32
3.6. Toxidez	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
6. REFERÊNCIAS	61
7. ANEXO	71

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A candidose é uma infecção fúngica de caráter oportunista, causada por espécies de *Candida*. O gênero *Candida* compreende mais de 160 espécies, sendo apenas um número reduzido dessas, cerca de vinte, que estão comprovadamente associadas a processos patológicos humanos, devendo-se destacar: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, complexo *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida kefyr*, *Candida lusitanae*, *Candida rugosa*, *Candida guilliermondii* e *Candida dubliniensis*. (MORAN et al, 2004; OLIVEIRA et al., 2007; BARBEDO; SGARBI, 2010; KOTHAVADE et al., 2010; THOMPSON et al , 2010; HÁ et al., 2011; ZOMORODIAN et al , 2011).

As espécies de *Candida* compreendem leveduras comensais eucarióticas e, nos mamíferos, residem mais comumente nas superfícies mucosas do trato gastrointestinal e genitourinário (KUMAMOTO, 2011; SILVA-ROCHA et al., 2014). Exibem considerável plasticidade morfogênica, podendo crescer na forma unicelular, chamada de blastoconídios, que predomina nas formas comensais, e nas formas pseudo-hifas e hifas verdadeiras, que estão associadas aos estados patológicos. Essas últimas são mais resistentes aos mecanismos de defesa do hospedeiro, enquanto que os blastoconídios (leveduras) são mais sujeitos a ação dos fagócitos do sistema celular de defesa (BARBEDO; SGARBI, 2010).

A *Candida albicans* tem sido descrita na literatura como a prevalente e mais patogênica das espécies de *Candida*. É responsável pela maioria dos casos de candidose oral e sistêmica (MORAN et al , 2004; THOMPSON et al , 2010; ZOMORODIAN et al , 2011; MCMANUS; COLEMAN, 2014). A *C.albicans* é uma espécie dimórfica que pode crescer como levedura ou forma filamentosa, e é uma das duas únicas espécies de *Candida*, capazes de formar verdadeiras hifas, assim como a *C.dubliniensis*. As hifas desempenham um papel fundamental nos processos de aderência e invasão de tecidos. (STOKES et al , 2007; ASMUNDSDÓTTIR et al , 2009; MCMANUS; COLEMAN, 2014).

As infecções causadas por *Candida* são mais frequentemente superficiais, ocorrendo nas superfícies mucosas úmidas dos indivíduos. Em pacientes gravemente imunocomprometidos, as infecções podem ser sistêmica e são significativas por causa de sua alta taxa de mortalidade associada (VAZQUEZ, 2010). Na candidose oral, os fatores predisponentes para o desenvolvimento da candidose oral podem ser classificados em fatores locais, tais como: uso de prótese, fluxo salivar reduzido e dieta rica em açúcar; e fatores sistêmicos do hospedeiro como idade avançada, doenças endócrinas a exemplo da diabetes,

imunossupressão, uso de antibióticos de largo espectro e deficiências nutricionais. (WILLIAMS; LEWIS, 2011).

Um recurso importante associado com a infecção por *C.albicans* é a formação de comunidades microbianas associadas à superfície, ou seja, o biofilme (MAYER et al., 2013). A formação deste biofilme é complexa, começa com a adesão de células de levedura a um substrato e a subsequente proliferação de células que formam uma camada basal ao longo da superfície de suporte (TSAI et al., 2014). O biofilme posteriormente entra na fase de maturação, que é caracterizada pelo crescimento de levedura, a elevação de crescimento de hifas, e de produção de materiais de matriz extracelular. Finalmente, as células amadurecem dispersas do biofilme no ambiente circundante (LOPEZ-RIBOT, 2005; BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006; FINKEL; MITCHELL, 2011; TSAI et al., 2014)

Diversos fármacos são utilizados no tratamento de infecções fúngicas e dentre os mais indicados para o tratamento de candidose oral, destacam-se os derivados azólicos (fluconazol, miconazol e itraconazol) e os poliênicos (anfotericina B e nistatina) (ALMEIDA et al., 2012). Os antifúngicos azóis atuam inibindo enzimas oxidativas associadas ao Citocromo P450 (CYP) e lanosterol 14 α -desmetilase, bloqueando a conversão de lanosterol em ergosterol e levando a uma alteração da permeabilidade da membrana, prejudicando assim a estrutura e função da membrana celular fúngica (WILLIAMS; LEWIS, 2011). Por meio da inibição do citocromo P450 humano (CYP), os azóis podem iniciar interações medicamentosas indesejáveis, reduzindo a absorção do medicamento e aumentando o risco de efeitos adversos, bem como contribuindo para o surgimento de resistência da *Candida*. (WAKIEC et al., 2007; LEWIS, 2011). Os antifúngicos poliênicos ligam-se diretamente ao ergosterol formando canais transmembranares, o que aumenta significativamente a permeabilidade da membrana e causa vazamento do conteúdo celular (ZOTCHEV, 2003; CROY; KNOW, 2004; SILVA et al., 2006) . No entanto, apesar de uma maior afinidade para o esterol ergosterol, há uma tendência de que os poliênicos interajam também com o componente de membrana humana, colesterol, e isso pode levar a efeitos colaterais (ZOTCHEV, 2003; SHAPIRO et al., 2011).

O aumento de casos de infecções causadas por espécies de *Candida* e a consequente utilização excessiva de antimicrobianos, favoreceram, nas últimas décadas, à resistência dessas leveduras aos agentes antifúngicos convencionais (PINTO et al., 2008). Além disso, o aumento da resistência fúngica aos agentes terapêuticamente disponíveis é consequência do crescimento da população imunocomprometida e do uso cada vez mais frequente de profilaxia e auto-medicação (WANNMARCHER; FERREIRA, 2007). Adicionalmente, os antifúngicos clinicamente utilizados apresentam alguns inconvenientes em termos de toxidez, eficácia e

custo. Assim, existe uma grande demanda por novos antifúngicos de diferentes classes estruturais, agindo seletivamente sobre novas metas, com menos efeitos colaterais (ABAD; ANSUATEGUI; BERMEJO, 2007; MENEZES et al., 2009). Nesta perspectiva, alguns trabalhos têm investigado a atividade antifúngica de plantas medicinais com vistas ao desenvolvimento de novos fármacos (NAIR, 2007; ALVES et al., 2009; COSTA et al., 2009; MENEZES, 2009; PAIVA et al., 2009; KOLACZKOWSKI et al., 2010; IRSHAD et al., 2011; MADHUMITHA; SARAL, 2011; JOTHY et al., 2012; AZIZ et al., 2013; ROUIS et al., 2013; SADOWSKA et al., 2014).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), plantas medicinais seriam a melhor fonte para obter variedade de drogas. No entanto, essas plantas devem ser investigados para compreender melhor as suas propriedades, segurança e eficiência (YADAV; AGARWALA, 2011). A utilização de células vegetais para a produção de compostos naturais ou recombinantes de interesse comercial ganha cada vez mais atenção nas últimas décadas. Isso porque as plantas possuem um mecanismo denominado metabolismo secundário, imprescindível para a sobrevivência de uma espécie dentro de um ecossistema. Os metabólitos secundários das plantas desempenham um papel importante na adaptação das plantas ao seu ambiente, o que representa uma importante fonte de produtos farmacêuticos (HUSSAIN et al., 2012).

As plantas medicinais são fontes potenciais de moléculas bioativas com estrutura diferenciada e mecanismo de ação inovador, características que tem motivado a indústria farmacêutica a incentivar pesquisas visando desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos (TRABULSI FILHO et al., 2013). Esse estímulo é fundamentado nas vantagens largamente atribuídas aos fitoterápicos como custos reduzidos e valorização das tradições populares. Considera-se, também, a comprovação científica dos efeitos sinérgicos decorrentes dos vários constituintes químicos presentes em uma espécie vegetal, com enfoque na associação dos seus compostos, que interagem em diferentes alvos moleculares, contribuindo na eficácia terapêutica. Isto sinalizada a necessidade de investigação científica incluindo espécies vegetais, principalmente as de amplo emprego na prática popular, selecionadas por estudos etnofarmacológicos, uma vez que constitui estratégias na busca de novos agentes terapêuticos.

Dentre as plantas potencialmente utilizadas pela população para fins medicinais encontra-se a *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *A.colubrina*, Leguminosae da subfamília Mimosoideae é popularmente conhecida como angico (OLIVEIRA et al., 2012) e utilizada pela população para tratamento de diarreia, tosse, bronquite, gripe, inflamações alergia, prurido, constipação, gastrite, entre outros usos (ALBUQUERQUE et al., 2007;

MEDEIROS et al., 2013; PEDONE-BONFIM et al., 2013). Estudos já comprovaram efeito analgésico de partes dessa planta devido aos seus efeitos anti-nociceptivos, mediado por mecanismos centrais e periféricos (DAMASCENA et al., 2014), como também potencial de cicatrização e reparação tecidual (PESSOA et al., 2012) e ainda atividade antimicrobiana contra biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* (TRENTIN et al., 2013), contra *Staphylococcus aureus* (ROCHA et al., 2013; SILVA et al., 2013) e *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* (ROCHA et al., 2013). A atividade antifúngica de *A.colubrina* já foi demonstrada por Lima et al. (2014) contra *Candida albicans*, no entanto, há necessidade de novos estudos com outras espécies padrão de *Candida* bem como de isolados clínicos.

2.OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar propriedades biológicas do extrato da casca da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, relacionadas ao seu perfil antifúngico, fitoquímico e térmico.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar o potencial antifúngico do extrato hidroalcoólico da casca de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan sobre espécies de *Candida* padrão e isolados clínicos recentes;
- ✓ Avaliar a ação do extrato hidroalcoólico da casca de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan sobre a parede celular da *Candida albicans*;
- ✓ Analisar a morfologia celular da *C. albicans*, tratada com o extrato vegetal, por meio da microscopia eletrônica de varredura;
- ✓ Avaliar o efeito interativo entre o extrato vegetal e um antifúngico padrão (nistatina) frente à *Candida albicans*;
- ✓ Determinar a cinética do crescimento/morte celular da *Candida albicans* frente ao extrato vegetal, ao antifúngico padrão e sua associação;
- ✓ Avaliar a toxidez do extrato vegetal da casca de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan através do método de hemólise;
- ✓ Analisar o perfil fitoquímico quantitativo do extrato vegetal;
- ✓ Traçar o perfil térmico do extrato vegetal.

3.MATERIAL E MÉTODO

3. MATERIAL E MÉTODO

As etapas de realização da metodologia utilizada estão distribuídas na figura 1.

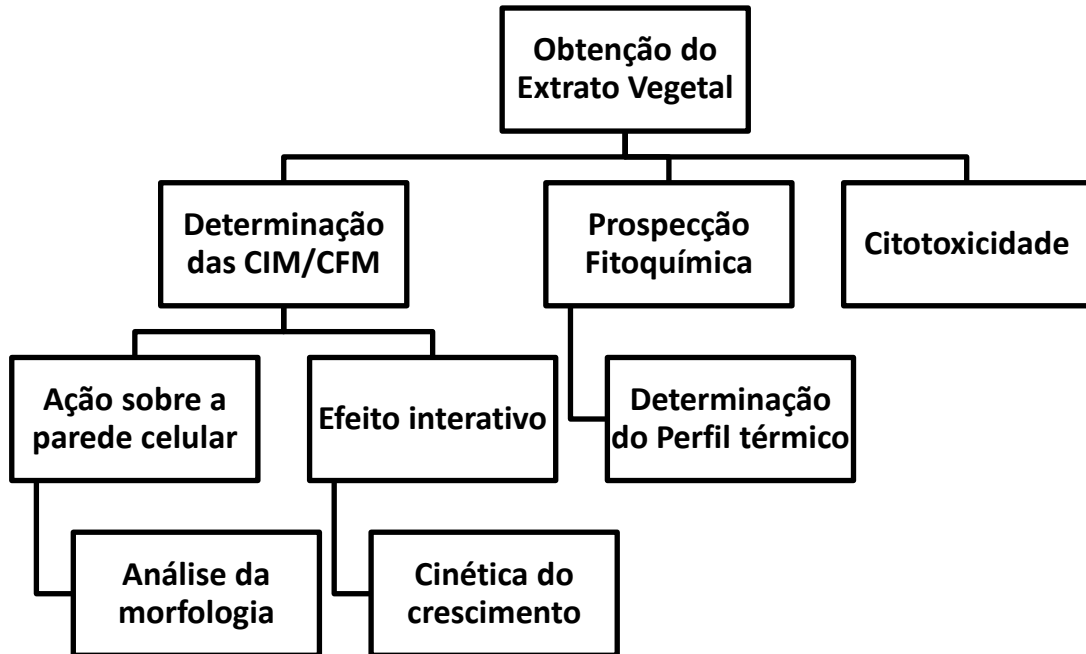


Figura 1: Fluxograma das etapas da metodologia realizada.

3.1. Material Vegetal

Foram utilizadas cascas da planta da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, coletadas na região do semiárido paraibano, na Serra de Bodocongó, no município de Queimadas (7°22' 25" S, 35° 59' 32"W), mesorregião da Borborema e micro região do Cariri Oriental, sob orientação de um botânico. O material foi limpo, acondicionado em sacos de papel e seco em estufa de circulação de ar a 40°C. O espécime testemunho encontra-se depositado na coleção do Herbário Manuel de Arruda Câmara (ACAM) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus I, Campina Grande, Paraíba sob o registro nº 667/ACAM.

3.2. Obtenção do Extrato Vegetal

Para obtenção dos extratos foi utilizado o processo de percolação em três filtragens casa 48 horas, em temperatura ambiente, utilizando como solvente o álcool etílico 80% em

uma proporção de 10g de planta seca moída para 25ml de álcool. O extrato foi evaporado à vácuo a cada extração, sendo liofilizado ao final das três filtrações. O material vegetal foi armazenado sob refrigeração.

3.3. Atividade Antimicrobiana

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados no Laboratório de Ensaios e Medicamentos-Labdem da Universidade Estadual da Paraíba.

3.3.1. Cepas microbianas

Os microrganismos utilizados foram: *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida krusei* (ATCC 34135), *Candida guilliermondii* (ATCC 6260), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida tropicalis* (ATCC 13803), cedidas pelo Laboratório de Materiais de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (Fundação Oswaldo Cruz- FIOCRUZ, Rio de Janeiro-RJ, Brasil). Também foram utilizadas cepas clínicas de *Candida albicans* (LM 11, LM 520, LM 70, LM 410) cedidas pelo Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba.

3.3.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada através da técnica de Microdiluição em Caldo, utilizando placas de 96 cavidades, com fundo em forma de “U” de (ALAMAR®). O inóculo microbiano foi preparado de acordo com as normas do documento M27A2 (CLSI, 2008). Foi padronizado em espectrofotômetro equivalente a uma absorbância de 0,08 a 0,10 a 530nm, e realizadas diluições seriadas de modo a obter uma solução microbiana diluída de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. Em cada poço da microplaca esterilizada de 96 poços, foram depositados 100 µL do meio de cultura caldo Sabouraud dextrose (marca). Foram acrescentados 100 µL do extrato vegetal na concentração de 8mg/ml no primeiro poço da coluna, e em seguida, realizou-se diluições seriadas, de modo que 100 µL do conteúdo do primeiro poço foram homogeneizados e transferidos para o seguinte, obtendo-se concentrações decrescentes entre 2000 e 15,62µg/mL. Os 100 µL finais foram desprezados. Posteriormente, 100 µL de uma suspensão das leveduras, de crescimento recente (24 horas)

foram adicionados. Paralelamente, foram realizados o controle de viabilidade da cepa de leveduras ensaiada e controle de sensibilidade da cepa frente à nistatina. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Para confirmação da presença de microrganismos viáveis nas concentrações não inibitórias, foram adicionados 10µl, em cada poço, da solução aquosa de resazurina a 0,01%. Os microrganismos viáveis foram reduzidos da coloração azul para a coloração rosa. O experimento foi realizado em triplicata.

3.3.3. Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Após a determinação da CIM, a concentração correspondente à inibitória e as duas concentrações imediatamente mais concentradas, bem como os controles positivos foram subcultivados em placas de ágar Sabouraud dextrose. Após 24 horas de incubação a 37°C, as leituras das CFMs foram realizadas, sendo considerada CFM a menor concentração do extrato que impediu o crescimento visível do subcultivo.

3.3.4. Ação do extrato vegetal de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan sob a parede celular de *Candida albicans*

A determinação da CIM do extrato vegetal na presença de sorbitol (0,8M) foi realizada pela técnica de microdiluição, utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades, com fundo em forma de “U” de (ALAMAR®). Em cada orifício da placa, foram adicionados 100µl do meio caldo Sabouraud Dextrose (CSD) previamente adicionado ao sorbitol de peso molecular de 132,17g (VETEC Química Fina Ltda – Rio de Janeiro/RJ). Posteriormente, 100µl do extrato vegetal foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações decrescentes de 32 a 0,25mg/ml extrato. Em seguida, foram adicionados 10ul do inóculo microbiano na concentração de 5×10^6 UFC/ml em cada cavidade. Um controle de microrganismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100ul do mesmo caldo Sabouraud Dextrose e sorbitol (0,8M), 100ul de água destilada estéril e 10ul do inóculo microbiano. Um controle de esterilidade também foi realizado, onde foram colocados 100ul do caldo Sabouraud Dextrose em um orifício sem a suspensão dos fungos. As microplacas foram inoculadas e incubadas a 37°C por 48 horas para ser realizada a leitura com auxílio do corante resazurina. O experimento foi realizado em triplicata.

3.3.5. Análise da Morfologia Celular

A morfologia celular da *C. albicans* tratada com o extrato vegetal foi analisada por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE). Alíquotas de cepas fúngicas tratadas com o extrato vegetal e nistatina, bem como de cepas livres de antifúngico, em meio de cultura, foram centrifugadas a 3500rpm por 15 minutos para a deposição do material biológico. Retirou-se o sobrenadante e fixou-se as amostras com uma solução de Glutaraldeído 2,5% e Tampão Cacodilato 0,1M. Realizou-se uma nova centrifugação e posterior lavagem com Tampão Caco 0,1M, e removendo-se o tampão, o material fúngico foi inserido em uma lamínula de vidro para e processado. O processamento consistiu de três lavagens com T.Caco 0,1M por 10 minutos, pós-fixação na proporção 1:1 Ósmio 2% + T.Caco 0,1M por 30 minutos para maior contraste do material na leitura, duas lavagens de T.Caco 0,1M por 10 minutos e duas lavagens com água destilada por 10 minutos. Também foi realizada a desidratação com lavagem em acetona nas concentrações 30%, 50%, 70%, 90% e 100%. O material foi seco em Ponto Crítico (CPD 030 BAL-TEC) por 2 horas, e em seguida, foi realizada a montagem em stubbs (fita de carbono e tinta de prata) que atuam como condutor de elétrons. Por fim, realizou-se a metalização com ouro por 30min no Metalizador (LEICA EM SCD 500) e analisou-se em Microscópio Eletrônico de Varredura (QUANTA 200 FEG).

3.3.6. Análise do efeito interativo

3.3.6.1. Método checkerboard

O efeito combinado das duas substâncias (nistatina e extrato vegetal de *A. colubrina*) foi determinado a partir da técnica de microdiluição – checkerboard para derivação do índice de concentração inibitória fracionada (Índice FIC). O inóculo microbiano foi padronizado em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 530nm de modo a obter uma absorbância de 0,08 a 0,10. Foram utilizadas soluções dos produtos testados em concentrações determinadas a partir de sua respectiva CIM. Inicialmente, 100ul do meio de cultura Sabouraud dextrose foram adicionados nos poços da microplaca estéril contendo 96 cavidades, com fundo em forma de “U” (ALAMAR[®]). Em seguida, 50ul de cada produto testado, em diversas concentrações (CIM/8, CIM/4, CIM/2, CIM, CIMx2, CIMx4 e CIMx8) foram adicionados no sentido vertical (nistatina) e horizontal (extrato vegetal) da microplaca, assim como mostra a

Figura 2. O crescimento fúngico foi evidenciado pelo uso da solução aquosa de resazurina a 0,01%. O ensaio foi realizado em triplicata sendo as microplacas incubadas a 37°C por 48 horas.

O índice FIC foi calculado através da soma do $FIC^A + FIC^B$, onde A representa o extrato vegetal e B a nistatina. O FIC^A , por sua vez, é calculado através da CIM^A combinado/ CIM^A sozinho, enquanto que o $FIC^B = CIM^B$ combinado/ CIM^B sozinho. Este índice foi interpretado da seguinte forma: sinergismo (<0,5), aditividade (0,5-1,0), indiferença (>1 e <4) ou antagonismo (>4) (ODDS, 2003).

Extrato vegetal de <i>Anandantianhera colubrina</i>	CIMx8							
	CIMx4							
	CIMx2							
	CIM							
	CIM÷2							
	CIM÷4							
	CIM÷8							
		CIM÷8	CIM÷4	CIM÷2	CIM	CIMx2	CIMx4	CIMx8
Nistatina								

Figura 2: Esquema para realização do ensaio para analisar o efeito interativo, pela técnica de checkerboard.

3.3.6.2. Cinética do crescimento/morte celular

O estudo da interferência do extrato vegetal, associado ou não à nistatina, sobre as cepas fúngicas foi realizado através do método de contagem de células viáveis. Inicialmente, 0,5ml da suspensão de leveduras foi inoculado em 4,5ml de caldo Sabouraud, contendo concentrações variadas do extrato (CIM/8; CIM/4, CIM), nistatina (CIM/8; CIM/4, CIM) e duas associação dos produtos (CIM/8 do extrato + CIM/4 da nistatina e CIM/8 da nistatina + CIM/4 do extrato). Nos intervalos 0min, 30 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 e 24 horas após a incubação, uma alíquota de 10ul desse inóculo foi uniformemente inoculada com auxílio de uma alça calibrada em placa de Petri, contendo Ágar Sabouraud dextrose. Também foi realizado o experimento controle, com crescimento livre de antifúngico. As placas inoculadas foram incubadas a 35°C por 48 horas. Após o período de incubação foi realizada a contagem do número de células viáveis, a qual foi expressa em UFC/ml e apresentada em forma da curva de morte microbiana. Os dados foram analisados e processados pelo Software SPSS versão

20.0. Foram aplicados os testes de Friedman e Kruskal Wallis com nível de significância de 5%.

3.4. Prospecção Fitoquímica

Os ensaios para a prospecção fitoquímica foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento e Ensaios em Medicamentos (LABDEM), Universidade Estadual da Paraíba.

3.4.1. Determinação do teor de polifenóis totais

Para a determinação do teor de polifenóis totais, utilizou-se o método descrito por Chandra e Mejía (2004). Adicionou-se 1 mL da solução aquosa do extrato a 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 1N, e esta mistura permaneceu em repouso por 2 minutos. Em seguida, adicionou-se 2 mL de uma solução aquosa de Na_2CO_3 a 20% (p/v), e a mistura permaneceu em repouso por mais 10 minutos. Em seguida, foi feita a leitura da absorbância a 757 nm em espectrofotômetro (Shimadzu[®] UV mini-1240), contra um branco composto por água destilada, reagente de Folin-Ciocalteu e solução a 20% de Na_2CO_3 .

A curva de calibração foi obtida a partir de soluções de ácido gálico nas concentrações de 1, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 35, e 40 $\mu\text{g/mL}$. A concentração de polifenóis foi expressa em miligramas equivalentes de ácido gálico. As análises foram realizadas em triplicata.

3.4.2. Determinação do teor de flavonoides

A determinação do conteúdo de flavonoides totais seguiu o método de Meda et al. (2005). A 5 mL de cada solução (em metanol) do extrato foi adicionado o mesmo volume de uma solução (em metanol) de AlCl_3 a 2% (p/v). A mistura permaneceu em repouso por 10 minutos antes da leitura da absorbância a 415 nm, contra um branco composto pela solução de AlCl_3 .

Utilizou-se para esta determinação uma curva de calibração obtida a partir de soluções de quercetina nas concentrações de 2, 4, 6, 8, 10, 13, 16, 19, 22, 26, 28 e 30 $\mu\text{g/mL}$. A

concentração de flavonóides foi expressa em miligramas equivalentes de quercetina. As análises foram realizadas em triplicata.

3.4.3. Determinação do teor de taninos condensados

O teor de taninos condensados foi quantificado utilizando-se o método de Makkar e Becker (1993), no qual 0,5 mL da amostra do extrato vegetal foi adicionado a 3 mL de uma solução de vanilina (4% p/v em metanol); em seguida, adicionou-se 1,5 mL de HCl concentrado (37%). A reação ocorreu em tubos de ensaio, mergulhados em água a cerca de 22 °C. A leitura foi feita a 500 nm, contra um branco composto pela solução de vanilina, HCl e uma solução de etanol 50% (v/v) em água.

A curva de calibração para este ensaio foi realizada utilizando-se soluções de catequina nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 µg/mL. A concentração de taninos condensados foi expressa em miligramas equivalentes de catequina. As análises foram realizadas em triplicata.

3.5. Perfil térmico

Os ensaios da análise térmica foram realizados no Laboratório de Análise Térmica da unidade do Laboratório de Certificação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste, Universidade Estadual da Paraíba (CERTBIO/UEPB.)

3.5.1. Termogravimetria (TG)

As curvas termogravimétricas (TG) não-isotérmicas foram obtidas utilizando-se um analisador simultâneo TG/DTA/DSC, modelo SDT Q600 (TA Instruments), usando cadinhos de alumina contendo amostras de $8 \pm 0,1$ mg, em atmosfera de nitrogênio, sob um fluxo de 50 mL min⁻¹. Os experimentos foram conduzidos entre as temperaturas de 25 a 900 °C, a uma razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹. Para a calibração do equipamento foi utilizado um padrão de oxalato de cálcio monohidratado.

3.5.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas DSC (calorimetria exploratória diferencial) foram obtidas em um calorímetro modelo DSC Q20 (TA Instruments), utilizando-se cadinhos de alumínio, contendo amostras de $2\pm 0,1$ mg, em atmosfera de nitrogênio, sob um fluxo de 50 mL min^{-1} . Os experimentos foram conduzidos entre as temperaturas de 25 a $400 \text{ }^\circ\text{C}$, a uma razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. Para a calibração do equipamento, foi utilizado um padrão de Índio (p.f. = $156,6 \text{ }^\circ\text{C}$).

3.6. Toxidez

A toxidez do extrato de *A.colubrina* foi analisada pelo método de hemólise. Preparou-se uma suspensão de hemácias 4% em solução salina 0,9%. Em seguida, 1 mL desta suspensão foi distribuída em tubos de ensaio e homogeneizadas com 1 mL do extrato diluído em diferentes concentrações a fim de se obter 0,25, 0,5, 1, 2 e 4mg/mL. Após 1 hora, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm, durante 10 minutos e foi realizada a leitura visual, levando em consideração a quantidade de hemácias que sofreram lise. A visualização da hemólise foi classificada como: – (0% de hemólise), + (25% de hemólise), ++ (50% de hemólise), +++ (75% de hemólise) e ++++ (100% de hemólise), conforme estabelecido por Luize et al. (2005). Essa leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm, (Shimadzu® UV mini – 1240), utilizando como branco a solução salina 5% para confirmar os resultados da leitura visual. Foram utilizados dois controles negativos, sendo um a suspensão de hemácias 4% e o outro o extrato vegetal diluído e como controle positivo foi utilizada a solução hemolizante Líquido de Turk.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

ARTIGO

Atividade antifúngica, caracterização fitoquímica e perfil térmico da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan

Eveline A. L. S. S. Rocha*, Edja M. M. B. Costa, Ana Cláudia D. Medeiros, Ricardo D. Castro, Ceildo P Santana, Larissa R A Silva, Cibelle S S Aleixo, Priscilla G Silva.

Programa de Pós Graduação em Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba-UEPB, Campjna Grande, PB, Brasil.

RESUMO

Objetivou-se investigar o perfil antifúngico da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, suas características fitoquímicas, térmicas e tóxica. Para avaliação do potencial antifúngico realizou-se a técnica da microdiluição em caldo, com determinação das Concentrações Inibitória Mínima(CIM) e Fungicida Mínima (CFM), utilizando-se espécies de *Candida* padrão e isolados clínicos recentes de *Candida albicans*, análise da ação sobre a parede celular e da morfologia celular da *C. albicans* tratada com o extrato bem como avaliação do efeito interativo entre o extrato vegetal e a nistatina sobre a *C.albicans* através do método checkerboard e a cinética de crescimento da *C. albicans*. Na prospecção fitoquímica, determinou-se o teor de polifenóis totais, flavonoides totais e taninos condensados através de espectrofotometria. O perfil térmico foi traçado com a determinação das curvas termograviméricas (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). A toxidez foi avaliada através da quantificação de hemácias que sofreram lise. O extrato hidroalcolico da *A. colubrina* tem potencial fungistático frente todas as cepas testadas e age modificando a parede celular de *Candida albicans*. Houve sinergismo entre a nistatina e o extrato vegetal (FIC=0,375). O sinergismo mantido ao longo do tempo na curva de morte. Foram determinados 53,18% de polifenóis totais, 8,73% de taninos condensados e 0,28% de flavonoides. A curva TG mostrou a ocorrência de três etapas de decomposição térmica, a perda de massa mais significativa do extrato foi observada entre as temperaturas de 229,17°C e 657,39°C, com perda de 37,44%. As curvas DSC mostraram que os processos térmicos ocorreram no intervalo de temperatura entre 52,37 a 195,52°C. Nenhuma das concentrações

testadas chegou a ser a concentração citotóxica efetiva 50% (EC50). Conclui-se que o extrato vegetal da casca de *A.colubrina* é um recurso promissor na obtenção de um novos compostos para tratamento de candidose oral.

ABSTRACT

This study aimed to investigate the antifungal profile *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, their phytochemical, thermal and toxicity characteristics. To evaluate the antifungal potential was held Technique microdilution, with determination of Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) and Minimum Fungicidal (CFM), using standard species of *Candida* and recent clinical isolates of *Candida albicans*, analysis of the action on cell and cell morphology of *C.albicans* treated with the extract and evaluate the interactive effect between the plant extract and nystatin on *C.albicans* through the checkerboard method and the kinetics of growth of *C.albicans* wall. In phytochemical screening, we determined the content of total polyphenols, total flavonoids and condensed tannins by spectrophotometry. The thermal profile was traced with the determination of termograviméricas curves (TG) and differential scanning calorimetry (DSC). The toxicity was evaluated by measuring erythrocyte lysed. The hydroalcoholic extract of *A.colubrina* has fungicidal potential against all tested strains and acts modifying the cell wall of *Candida albicans*. There was synergism between the nystatin and the plant extract (FIC = 0.375). Synergism maintained over time in the kill curve. 53.18% of total polyphenols were determined, 8.73% from 0.28% condensed tannins and flavonoids. The TG curve showed the presence of three stages of thermal decomposition, the more significant weight loss was observed between the extract temperatures and 229,17°C 657,39°C with loss of 37.44%. DSC curves show that the thermal processes occurred in the temperature range of 52.37 to 195,52°C. None of the tested concentrations became effective cytotoxic concentration 50% (EC50). It is concluded that the plant extract from the bark of *A.colubrina* is a promising resource in getting a new compound for the treatment of oral candidiasis.

*Correspondência: evelpb@hotmail.com

¹Artigo adequado às normas da Revista Plos One (normas de submissão em anexo), a ser traduzido para a língua inglesa e submetido após as correções da banca avaliadora.

INTRODUÇÃO

A candidose da região orofaríngea é a infecção oportunista mais frequente, com alta taxa de ocorrência, com predomínio da *Candida albicans* [1]. Os fatores predisponentes para o desenvolvimento da candidose oral podem ser classificados em fatores locais tais como uso de prótese, fluxo salivar reduzido e dieta rica em açúcar e fatores sistêmicos do hospedeiro como idade avançada, doenças endócrinas a exemplo da diabetes, imunossupressão, uso de antibióticos de largo espectro e deficiências nutricionais [2].

Diversos fármacos são utilizados no tratamento de infecções fúngicas e dentre os mais indicados para o tratamento da candidose oral, destacam-se o miconazol, do grupo dos derivados azólicos e a nistatina do grupo dos poliênicos [3]. No entanto, a maioria dos antifúngicos clinicamente utilizados tem vários inconvenientes. O miconazol pode iniciar interações medicamentosas indesejáveis, reduzindo a absorção do medicamento e aumentando o risco de efeitos adversos por meio da inibição do citocromo P450 humano [4,5]. A nistatina por ligar-se diretamente ao ergosterol, pode interagir também com o componente de membrana humana, colesterol, e isso pode levar a efeitos colaterais [6,7]. Além da toxicidade, a utilização frequentemente desses antifúngicos leva ao aparecimento de espécies resistentes. Assim, existe uma grande demanda por novos antifúngicos de diferentes classes estruturais, agindo seletivamente sobre novos alvos celulares, com menos efeitos colaterais [8]. Nesta perspectiva, tem sido investigada a atividade antifúngica de plantas medicinais com vistas ao desenvolvimento de novos medicamentos.

Dentre as plantas potencialmente utilizadas pela população para fins medicinais encontra-se a *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. É popularmente conhecida como angico [9] e utilizada pela população para tratamento de diarreia, tosse, bronquite, gripe, inflamações e dano tecidual, alergia, prurido, constipação, gastrite entre outros usos [10-12]. Estudos já comprovaram efeito analgésico de partes dessa planta devido aos seus efeitos anti-nociceptivos, mediado por mecanismos centrais e periféricos [13], como também potencial de cicatrização e reparação tecidual [14], e ainda atividade antimicrobiana contra biofilme de *P. aeruginosa* [15], contra *Staphylococcus aureus* [16,17] e *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* [16] e contra biofilme de *Candida albicans* [18]. O presente estudo objetiva investigar propriedades biológicas do extrato hidroalcoólico da casca da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, relacionadas ao seu perfil antifúngico, fitoquímico e térmico.

MATERIAL E MÉTODO

Obtenção do Extrato Vegetal

Foram utilizadas cascas da planta da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, coletadas na região do semiárido paraibano, na Serra de Bodocongó, no município de Queimadas (7°22' 25" S, 35° 59' 32"W), mesorregião da Borborema e micro região do Cariri Oriental, sob orientação de um botânico. O material foi limpo, acondicionado em sacos de papel e seco em estufa de circulação de ar a 40°C. O espécime testemunho encontra-se depositado na coleção do Herbário Manuel de Arruda Câmara (ACAM) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus I, Campina Grande, Paraíba sob o registro nº 667/ACAM. Para obtenção dos extratos foi utilizado o processo de percolação em três filtragens casa 48 horas, em temperatura ambiente, utilizando como solvente o álcool etílico 80% em uma proporção de 10g de planta seca moída para 25ml de álcool. O extrato foi evaporado à vácuo a cada extração, sendo liofilizado ao final das três filtragens. O material vegetal foi armazenado sob refrigeração.

Atividade antimicrobiana

Microrganismos

Os microrganismos utilizados foram: *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida krusei* (ATCC 34135), *Candida guilliermondii* (ATCC 6260), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida tropicalis* (ATCC 13803), cedidas pelo Laboratório de Materiais de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (Fundação Oswaldo Cruz- FIOCRUZ, Rio de Janeiro-RJ, Brasil). Também foram utilizadas cepas clínicas de *Candida albicans* (LM 11, LM 520, LM 70, LM 410) cedidas pelo Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada através da técnica de Microdiluição em Caldo, utilizando placas de 96 cavidades, com fundo em forma de “U” de (ALAMAR®). O inóculo microbiano foi preparado de acordo com as normas do

documento M27A2 (CLSI, 2008). Foi padronizado em espectrofotômetro equivalente a uma absorvância de 0,08 a 0,10 a 530nm, e realizadas diluições seriadas de modo a obter uma solução microbiana diluída de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. Em cada poço da microplaca esterilizada de 96 poços, foram depositados 100 μ L do meio de cultura caldo Sabouraud dextrose (marca). Foram acrescidos 100 μ L do extrato vegetal na concentração de 8mg/ml no primeiro poço da coluna, e em seguida, realizou-se diluições seriadas, de modo que 100 μ L do conteúdo do primeiro poço foram homogeneizados e transferidos para o seguinte, obtendo-se concentrações decrescentes entre 2000 e 15,62 μ g/mL. Os 100 μ L finais foram desprezados. Posteriormente, 100 μ L de uma suspensão das leveduras, de crescimento recente (24 horas) foram adicionados. Paralelamente, foram realizados o controle de viabilidade da cepa de leveduras ensaiada e controle de sensibilidade da cepa frente à nistatina. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Para confirmação da presença de microrganismos viáveis nas concentrações não inibitórias, foram adicionados 10 μ l, em cada poço, da solução aquosa de resazurina a 0,01%. Os microrganismos viáveis foram reduzidos da coloração azul para a coloração rosa. O experimento foi realizado em triplicata.

Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Após a determinação da CIM, a concentração correspondente à inibitória e as duas concentrações imediatamente mais concentradas, bem como os controles positivos foram subcultivados em placas de ágar Sabouraud dextrose. Após 24 horas de incubação a 37°C, as leituras das CFMs foram realizadas, sendo considerada CFM a menor concentração do extrato que impediu o crescimento visível do subcultivo.

Ação sobre a parede celular de *Candida albicans*

A determinação da CIM do extrato vegetal na presença de sorbitol (0,8M) foi realizada pela técnica de microdiluição, utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades, com fundo em forma de “U” de (ALAMAR®). Em cada orifício da placa, foram adicionados 100 μ l do meio caldo Sabouraud Dextrose (CSD) previamente adicionado ao sorbitol de peso molecular de 132,17g (VETEC Química Fina Ltda – Rio de Janeiro/RJ). Posteriormente, 100 μ l do extrato vegetal foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações decrescentes de 32 a 0,25mg/ml extrato. Em seguida, foram adicionados 10 μ l do inóculo microbiano na

concentração de 5×10^6 UFC/ml em cada cavidade. Um controle de microrganismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100ul do mesmo caldo Sabouraud Dextrose e sorbitol (0,8M), 100ul de água destilada estéril e 10ul do inoculo microbiano. Um controle de esterilidade também foi realizado, onde foram colocados 100ul do caldo Sabouraud Dextrose em um orifício sem a suspensão dos fungos. As microplacas foram semeadas e incubadas a 37°C por 48 horas para ser realizada a leitura com auxílio do corante resazurina. O experimento foi realizado em triplicata.

Análise da Morfologia Celular de *Candida albicans*

A morfologia celular da *C. albicans* tratada com o extrato vegetal foi analisada por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE). Alíquotas de cepas fúngicas tratadas com o extrato vegetal e nistatina, bem como de cepas livres de antifúngico, em meio de cultura, foram centrifugadas a 3500rpm por 15 minutos para a deposição do material biológico. Retirou-se o sobrenadante e fixou-se as amostras com uma solução de Glutaraldeído 2,5% e Tampão Cacodilato 0,1M. Realizou-se uma nova centrifugação e posterior lavagem com Tampão Caco 0,1M, e removendo-se o tampão, o material fúngico foi inserido em uma lamínula de vidro para e processado. O processamento consistiu de três lavagens com T.Caco 0,1M por 10 minutos, pós-fixação na proporção 1:1 Ósmio 2% + T.Caco 0,1M por 30 minutos para maior contraste do material na leitura, duas lavagens de T.Caco 0,1M por 10 minutos e duas lavagens com água destilada por 10 minutos. Também foi realizada a desidratação com lavagem em acetona nas concentrações 30%, 50%, 70%, 90% e 100%. O material foi seco em Ponto Crítico (CPD 030 BAL-TEC) por 2 horas, e em seguida, foi realizada a montagem em stubbs (fita de carbono e tinta de prata) que atuam como condutor de elétrons. Por fim, realizou-se a metalização com ouro por 30min no Metalizador (LEICA EM SCD 500) e analisou-se em Microscópio Eletrônico de Varredura (QUANTA 200 FEG).

Análise do efeito interativo

Método Checkerboard

O efeito combinado das duas substâncias (nistatina e extrato vegetal de *A. colubrina*) foi determinado a partir da técnica de microdiluição – checkerboard para derivação do índice

de concentração inibitória fracionada (Índice FIC). O inóculo microbiano foi padronizado em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 530 nm de modo a obter uma absorbância de 0,08 a 0,10. Foram utilizadas soluções dos produtos testados em concentrações determinadas a partir de sua respectiva CIM. Inicialmente, 100ul do meio de cultura Sabouraud dextrose foram adicionados nos poços da microplaca estéril contendo 96 cavidades, com fundo em forma de “U” (ALAMAR[®]). Em seguida, 50ul de cada produto testado, em diversas concentrações (CIM/8, CIM/4, CIM/2, CIM, CIMx2, CIMx4 e CIMx8) foram adicionados no sentido vertical (nistatina) e horizontal (extrato vegetal) da microplaca, assim como mostra a Figura 2. O crescimento fúngico foi evidenciado pelo uso da solução aquosa de resazurina a 0,01%. O ensaio foi realizado em triplicata sendo as microplacas incubadas a 37°C por 48 horas.

O índice FIC foi calculado através da soma do $FIC^A + FIC^B$, onde A representa o extrato vegetal e B a nistatina. O FIC^A , por sua vez, é calculado através da CIM^A combinado/ CIM^A sozinho, enquanto que o $FIC^B = CIM^B$ combinado/ CIM^B sozinho. Este índice foi interpretado da seguinte forma: sinergismo (<0,5), aditividade (0,5-1,0), indiferença (>1 e <4) ou antagonismo (>4) [19].

Cinética do Crescimento

O estudo da interferência do extrato vegetal, associado ou não à nistatina, sobre as cepas fúngicas foi realizado através do método de contagem de células viáveis. Inicialmente, 0,5ml da suspensão de leveduras foi inoculado em 4,5ml de caldo Sabouraud contendo concentrações variadas do extrato (CIM/8; CIM/4, CIM), nistatina (CIM/8; CIM/4, CIM) e duas associação dos produtos (CIM/8 do extrato + CIM/4 da nistatina e CIM/8 da nistatina + CIM/4 do extrato). Nos intervalos 0min, 30 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 e 24 horas após a incubação, uma alíquota de 10ul desse inóculo foi uniformemente inoculada em placa de Petri contendo Ágar Sabouraud dextrose. Também foi realizado o experimento controle, com crescimento livre de antifúngico. As placas inoculadas foram incubadas a 35°C por 48 horas. Após o período de incubação, foi realizada a contagem do número de células viáveis, a qual foi expressa em UFC/ml e apresentada em forma da curva de morte microbiana. Os dados foram analisados e processados pelo Software SPSS versão 20.0. Foram aplicados os testes de Friedman e Kruskal Wallis com nível de significância de 5%.

Prospecção Fitoquímica

Para a determinação do teor de polifenóis totais, utilizou-se o método descrito por Chandra e Mejía [20] com adição de 1 mL da solução aquosa do extrato a 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 1N, e após um repouso de 2 minutos, adicionou-se 2 mL de uma solução aquosa de Na_2CO_3 a 20% (p/v), permanecendo em repouso por mais 10 minutos. Em seguida, foi feita a leitura da absorbância a 757 nm em espectrofotômetro (Shimadzu® UV mini – 1240), contra um branco composto por água destilada, reagente de Folin-Ciocalteu e solução a 20% de Na_2CO_3 . A curva de calibração foi obtida a partir de soluções de ácido gálico nas concentrações de 1, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 35, e 40 $\mu\text{g/mL}$. A concentração de polifenóis foi expressa em miligramas equivalentes de ácido gálico.

A determinação do conteúdo de flavonoides totais seguiu o método de Meda et al. [21] em que 5 mL de cada solução (em metanol) do extrato foram adicionados o mesmo volume de uma solução (em metanol) de AlCl_3 a 2% (p/v). A mistura permaneceu em repouso por 10 minutos antes da leitura da absorbância a 415 nm, contra um branco composto pela solução de AlCl_3 . Utilizou-se para esta determinação uma curva de calibração obtida a partir de soluções de quercetina nas concentrações de 2, 4, 6, 8, 10, 13, 16, 19, 22, 26, 28 e 30 $\mu\text{g/mL}$. A concentração de flavonoides foi expressa em miligramas equivalentes de quercetina.

O teor de taninos condensados foi quantificado utilizando-se o método de Makkar et al. [22], no qual 0,5 mL da amostra do extrato vegetal foi adicionado a 3 mL de uma solução de vanilina (4% p/v em metanol); em seguida, adicionou-se 1,5 mL de HCl concentrado (37%). A reação ocorreu em tubos de ensaio, mergulhados em água a cerca de 22°C. A leitura foi feita a 500 nm, contra um branco composto pela solução de vanilina, HCl e uma solução de etanol 50% (v/v) em água. A curva de calibração para este ensaio foi realizada utilizando-se soluções de catequina nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 $\mu\text{g/mL}$. A concentração de taninos condensados foi expressa em miligramas equivalentes de catequina. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Perfil térmico

As curvas termograviméricas (TG) foram obtidas utilizando-se um analisador simultâneo TG/DTA/DSC, modelo SDT Q600 (TA Instruments), utilizando-se cadinhos de alumina, contendo amostras de $8 \pm 0,1$ mg, em atmosfera de nitrogênio, sob um fluxo de 50 mL

min⁻¹. Os experimentos foram conduzidos entre as temperaturas de 25 a 900 °C, a uma razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹. Para a calibração do equipamento foi utilizado um padrão de oxalato de cálcio monohidratado. As curvas DSC (calorimetria exploratória diferencial) foram obtidas em um calorímetro modelo DSC Q20 (TA Instruments), utilizando-se cadinhos de alumínio, contendo amostras de 2±0,1 mg, em atmosfera de nitrogênio, sob um fluxo de 50 mL min⁻¹. Os experimentos foram conduzidos entre as temperaturas de 25 a 400 °C, a uma razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹. Para a calibração do equipamento, foi utilizado um padrão de Índio (p.f. = 156,6 °C).

Toxidez

A toxidez do extrato de *A.colubrina* foi analisada pelo método de hemólise. Preparou-se uma suspensão de hemácias 4% em solução salina 0,9%. Em seguida, 1 mL desta suspensão foi distribuída em tubos de ensaio e homogeneizadas com 1 mL do extrato diluído em diferentes concentrações a fim de se obter 0,25, 0,5, 1, 2 e 4mg/mL. Após 1 hora, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm, durante 10 minutos e foi realizada a leitura visual, levando em consideração a quantidade de hemácias que sofreram lise. A visualização da hemólise foi classificada como: – (0% de hemólise), + (25% de hemólise), ++ (50% de hemólise), +++ (75% de hemólise) e ++++ (100% de hemólise), conforme estabelecido por Luize et al. [23]. Essa leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm, (Shimadzu® UV mini – 1240), utilizando como branco a solução salina 5% para confirmar os resultados da leitura visual. Foram utilizados dois controles negativos, sendo um a suspensão de hemácias 4% e o outro o extrato vegetal diluído e como controle positivo foi utilizada a solução hemolizante Líquido de Turk.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade Antimicrobiana

Os resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM) do extrato hidroalcoólico da *Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1: Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do extrato hidroalcoólico da casca de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan e da nistatina (Sigma-Aldrich®), contra espécies de *Candida*.

	ANGICO mg/ml		NISTATINA mg/ml	
	(CIM)	(CFM)	(CIM)	(CFM)
<i>C. albicans</i>	1	>2	0,006	0,006
<i>C. glabrata</i>	0,5	>2	0,006	0,006
<i>C. krusei</i>	1,	>2	0,006	0,03
<i>C. guilliermond</i>	1	>2	0,006	0,006
<i>C. tropicalis</i>	1	>2	0,006	0,01
<i>C.albicans</i>	0,5	0,5	0,006	0,006
LM11				
<i>C.albicans</i>	0,25	0,25	0,006	0,006
LM70				
<i>C. albicans</i>	0,5	0,5	0,006	0,006
LM 410				

A observação dos resultados obtidos neste ensaio possibilita afirmar que o extrato vegetal da casca de *Anadenanthera colubrina* possui potencial antifúngico de caráter fungistático para as cepas padrão e fungicida para os isolados clínicos e de acordo com Aligiannis et al. [24], esse potencial é considerado forte para os isolados clínicos e moderado para as cepas padrão. A atividade encontrada também está de acordo com outros autores que consideram o extrato ativo contra microrganismos em concentrações menores ou igual a 1mg/ml [25,26].

Ação sobre a parede celular

Na Tabela 2, demonstra-se a Concentrações Inibitória Mínima do extrato vegetal de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan frente à *Candida albicans* (ATCC 18804) na presença e ausência de sorbitol.

Tabela 2: Determinação da Concentração Inibitória Mínima do extrato vegetal de *A.colubrina* frente à cepas de *Candida albicans* na presença e ausência de sorbitol.

Microorganismo	CIM (sem sorbitol)	CIM (com sorbitol)	CONTROLES	
			Sorbitol	Esterilidade
<i>C.albicans</i>	1mg/ml	8mg/ml	+	-

(+) Presença de crescimento fúngico em caldo Sabouraud dextrose acrescido de sorbitol e ausência de drogas.

O método utilizado baseia-se nos danos que produtos com atividade antifúngica produzem aos componentes da parede celular fúngica. O sorbitol tem uma função osmoprotetora, e osmoproteção é essencial para o crescimento de fungos. As células fúngicas que carecem de parede celular ou possuem parede celular danificada não podem crescer na ausência de sorbitol. Caso o produto atue sob a parede celular do fungo, ele provocará lise celular quando na ausência de um estabilizador osmótico mas permitirá seu crescimento na presença desse suporte osmótico. O sorbitol, neste caso, funciona como o estabilizador osmótico para estabilizar os protoplastos de fungos. Os inibidores da parede celular dos fungos podem ser identificados quando os valores da CIM na presença do sorbitol são mais elevados do que os na sua ausência [27]. A elevação da CIM de 1mg/ml para 8mg/ml foi observada com relação ao extrato de *A.colubrina*, o que permite sugerir que esse extrato age modificando a parede celular do fungo.

A descoberta desse alvo de ação do extrato de *A.colubrina* representa um achado importante, uma vez que a parede celular dos fungos, que protege a célula das mudanças na pressão osmótica e outros stresses ambientais, ao mesmo tempo permitindo que a célula de fungo possa interagir com o seu ambiente, é uma estrutura que as células dos mamíferos não possuem [7,28]. Segundo Lacaz [29] e Chen et al. [30] há uma busca constante pelo desenvolvimento de novos antifúngicos que ofereçam seletividade e conseqüentemente mais segurança, que causem a inibição de um processo do patógeno que não exista no hospedeiro ou que sejam suficientemente diferentes, para que seu metabolismo seja pouco afetado. Desse

modo, o extrato vegetal de *A.colubrina* pode constituir um alvo para o desenvolvimento de drogas anti-fúngicas com maior especificidade.

Análise da Morfologia Celular

As fotomicrografias por MEV das amostras tratadas demonstram o efeito da suspensão de nistatina (100.000UI) utilizada usualmente na clínica odontológica (Figura 3), e do extrato vegetal (Figura 4) sobre *Candida albicans*. Na Figura 5 está representado o controle do microrganismo sem tratamento.

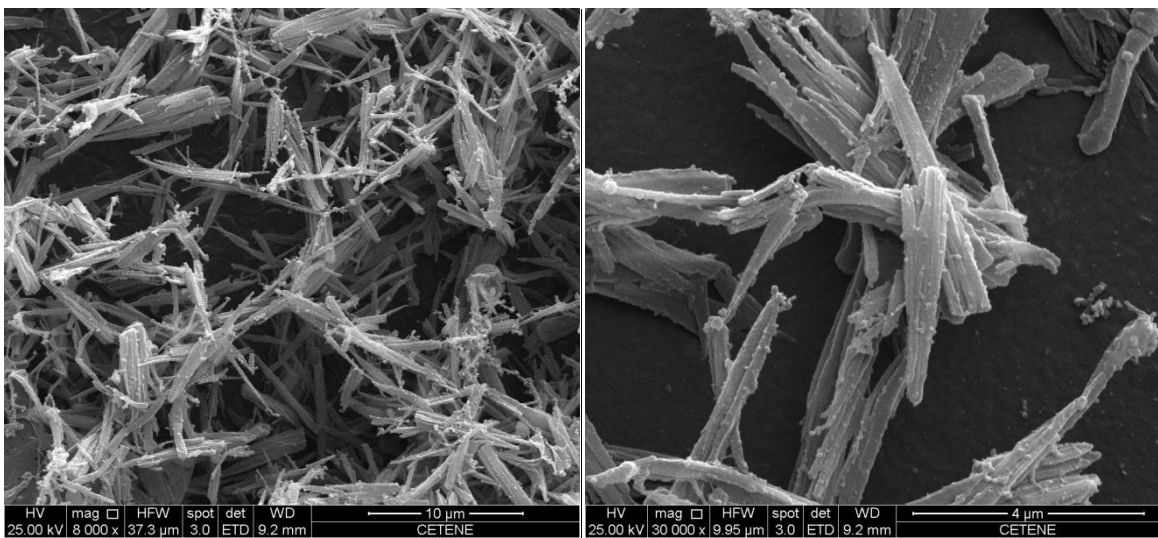


Figura 3: Fotomicrografia, por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), de cepas de *Candida albicans* (ATCC 18804) tratadas com nistatina (suspensão 100.000UI), após 24 horas de incubação a 37°C.

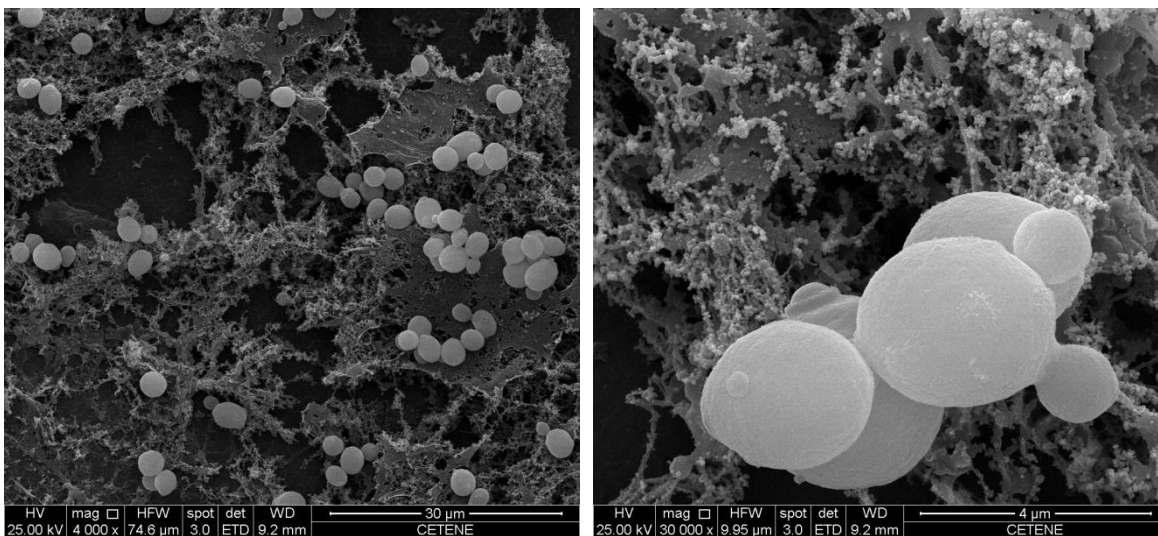


Figura 4: Fotomicrografia, por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), de cepas de *Candida albicans* (ATCC 18804) tratadas com extrato vegetal da casca de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (1mg/ml), após 24 horas de incubação a 37°C.

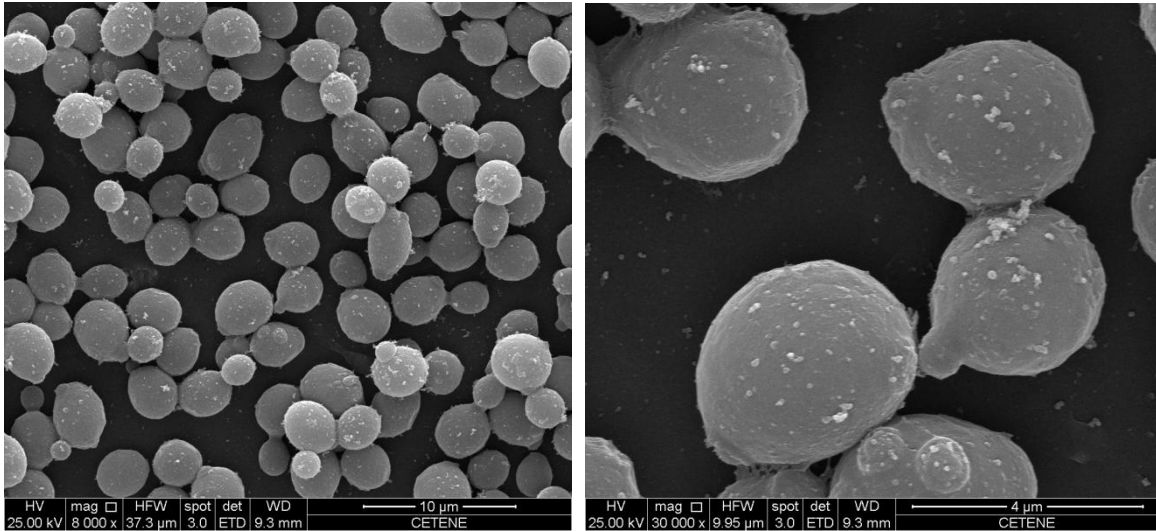


Figura 5: Fotomicrografia, por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), de *Candida albicans* (ATCC 18804) sem tratamento, após 24 horas de incubação a 37°C.

As imagens analisadas em MEV permitem visualizar redução na quantidade de células de *C.albicans*, quando comparadas aos controles, o que ratifica o perfil fungistático do extrato. Considerando a importância do equilíbrio e manutenção da microbiota oral, é aceitável a inativação do microrganismo por parte do extrato vegetal, sem removê-lo completamente da superfície em que reside comumente [31]. Também foi observada a modificação na parede celular da célula, apresentando perda do aspecto rugoso característico da célula sem tratamento, o que corrobora os achados de Lima et al. [16] que relataram o potencial de *A.colubrina* produzir alteração da parede celular da *Candida albicans*. Achados similares foram encontrados por Alves et al. [32] quando investigaram a ação do extrato de *Schinus terebinthifolius* sobre a parede celular da *Candida albicans* utilizando o mesmo método.

Efeito interativo

Checkboard

O efeito interativo entre o extrato de *A.colubrina* e a nistatina revelou atividade sinérgica, com FIC igual a 0,375 (Tabela 3).

Tabela 3: Concentração Inibitória Mínima (CIM) (ug / ml) do extrato vegetal e nistatina isolados e combinados e Índice de Concentração Inibitória Fractional (FIC) contra *C.albicans*.

Produto	MIC (sozinho) mg/ml
Extrato Vegetal	1
Nistatina	0,006
Produto	MIC (combinado) mg/ml
Extrato Vegetal	0,25 / 0,125
Nistatina	0,00075 / 0,0015
FIC = 0,375 (sinergismo)	

Diferentes mecanismos podem estar envolvidos na atividade sinérgica. Johnson et al. [33] e Castro et al. [34] descreveram quatro deles: 1) inibição de diferentes estágios nas vias bioquímicas, intracelulares fúngicas essenciais a sobrevivência celular; 2) aumento da penetração do agente antifúngico proporcionada pela ação do outro antifúngico na membrana celular fúngica; 3) inibição de proteinases carreadoras e 4) inibição de diferentes alvos celulares simultaneamente. Provavelmente esse quarto efeito pode corresponder ao mecanismo sinérgico do extrato vegetal da *A.colubrina* com a nistatina, uma vez que a nistatina atua na membrana plasmática da célula fúngica e o extrato vegetal atuou em nível da parede celular [4,5].

Um dos protocolos mais simples e conhecido para determinação da interação de antimicrobianos é o teste checkerboard, que proporciona uma disposição bidimensional de concentrações diferentes das substâncias avaliadas. Esse teste permite o cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracional (FIC) [19]. O efeito sinérgico entre fármacos sintéticos e produtos naturais é encontrado na literatura com outras plantas, a exemplo das *Melaleuca alternifolia*, *Thymus vulgaris*, *Mentha piperita* e *Rosmarinus officinalis* com ciprofloxacina contra *S. aureus* e *Klebsiella pneumonia*, e com a anfotericina B contra cepas de *C. Albicans* [35].

Cinética do Crescimento

A partir do sinergismo encontrado, foi avaliada a inibição do extrato vegetal e nistatina sobre o crescimento celular de *C.albicans*, como também o efeito de duas combinações selecionadas a partir das menores concentrações das substâncias combinadas capazes de inibir

a formação de microrganismos (Figura 6). Observou-se a redução do número de UFC/ml ($p < 0,05$) (Figuras 7, 8, 9).

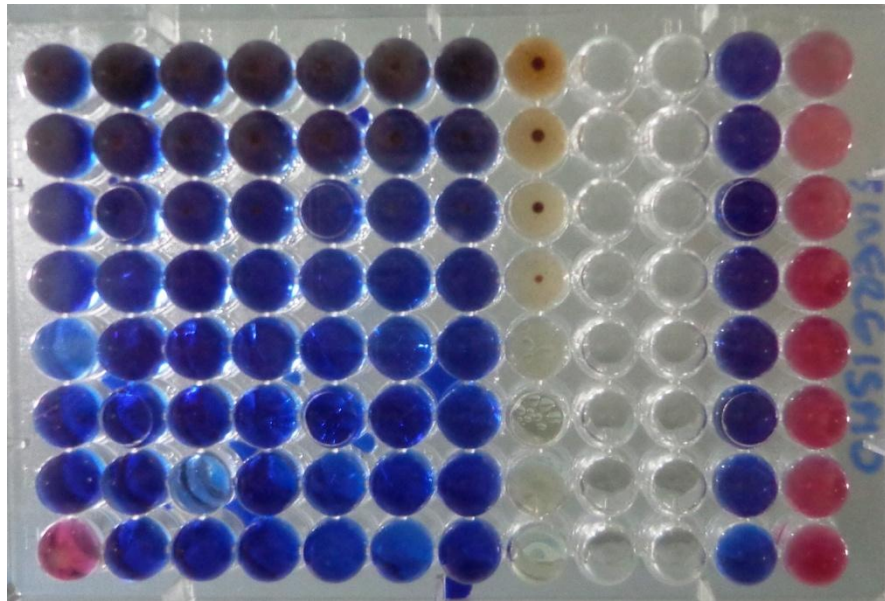


Figura 6: Microplaca da técnica de checkerboard após 24 horas de incubação a 37°C, evidenciando as menores concentrações das soluções combinadas capazes de inibir o crescimento fúngico: CIM/4 da nistatina + CIM/8 do extrato vegetal e CIM/8 da nistatina + CIM/4 do extrato vegetal.

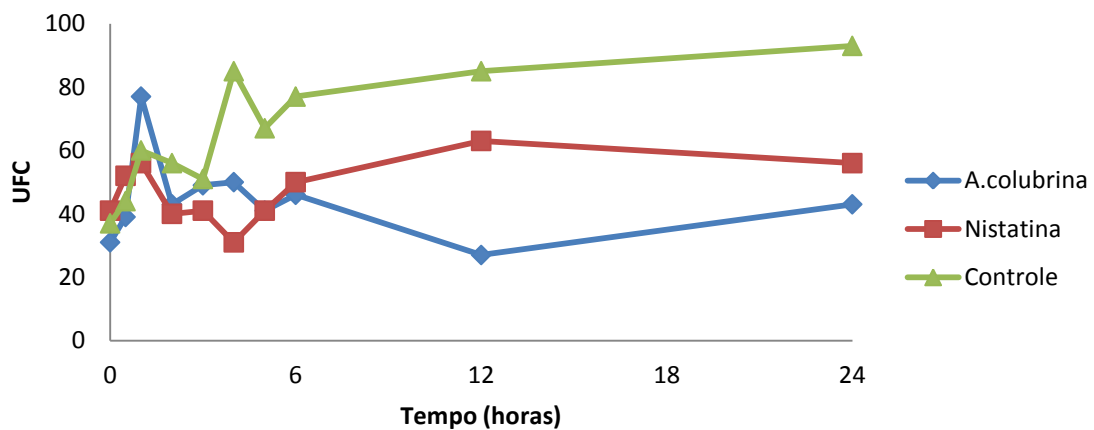


Figura 7: Cinética do crescimento de *C.albicans* (ATCC 18804) sob atividade dos produtos de teste em CIM.

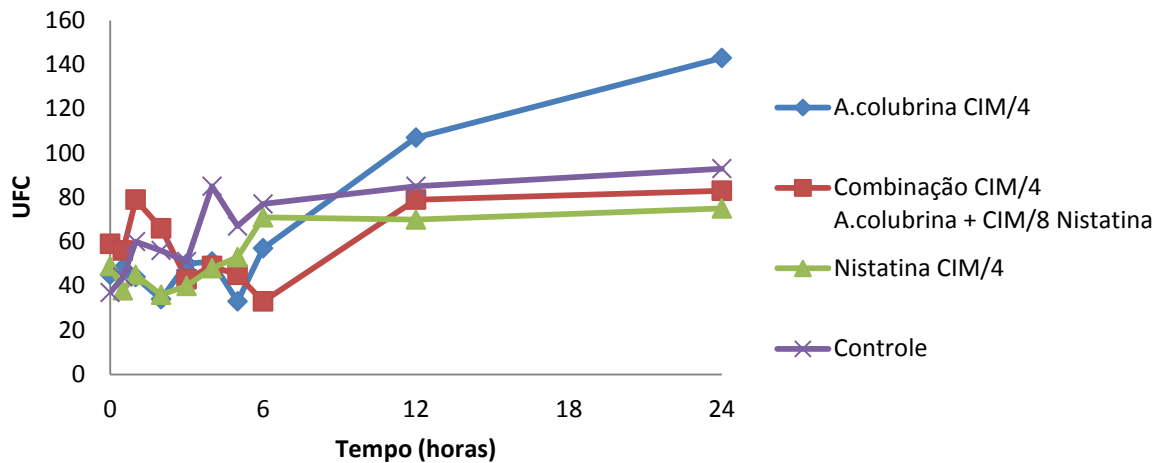


Figura 8: Cinética do crescimento de *C.albicans* (ATCC 18804) sob atividade dos produtos de teste em CIM÷4.

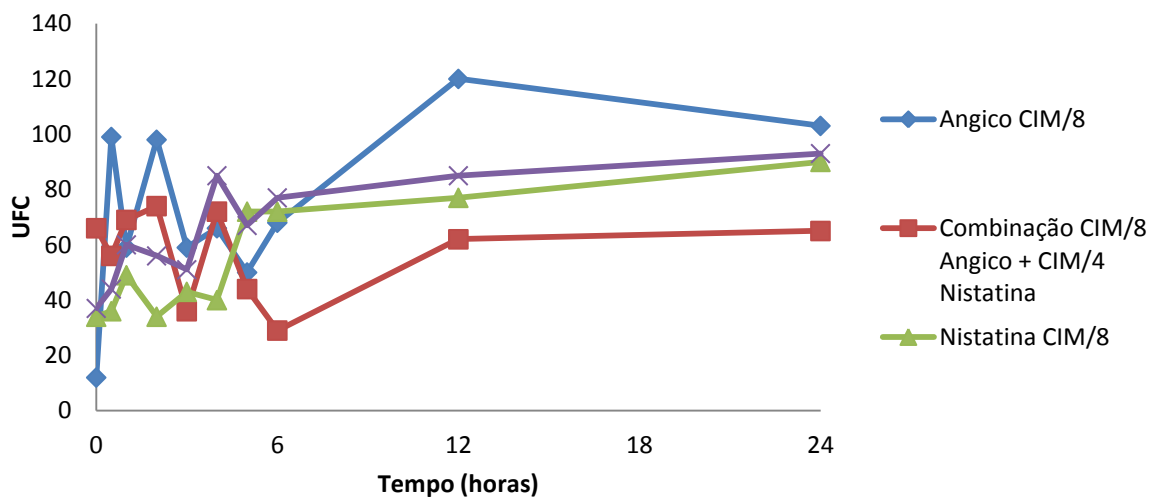


Figura 9: Cinética do crescimento de *C.albicans* (ATCC 18804) sob atividade dos produtos de teste em CIM÷8.

O efeito sinérgico entre o extrato da *A.colubrina* e nistatina, mesmo em baixas concentrações, foi mantido ao longo do tempo, havendo redução do número de UFC/ml em relação ao controle. Sabe-se que compostos antifúngicos associados podem promover maior eficácia, sendo os métodos checkerboard e a curva de morte microbiana indicados para esta avaliação *in vitro* [36].

As combinações sinérgicas de agentes antifúngicos podem ter efeitos positivos, como por exemplo, aumentar a taxa de eliminação fúngica, diminuir a duração da terapia, evitar o surgimento de resistência a drogas, ampliar o espectro de atividade, e diminuir a toxicidade relacionada com o fármaco, permitindo a utilização de doses mais baixas de agentes

antifúngicos [37]. Neste estudo, observou-se que o tempo de contato das substâncias com as células favoreceu positivamente tal redução. Esse fator tempo é importante na prospecção de antifúngicos, pois o uso prolongado de agentes antifúngicos e regimes posológicos prolongados parecem contribuir para o desenvolvimento de resistência microbiana [38].

Prospecção Fitoquímica

A prospecção fitoquímica do extrato da *A.colubrina* revelou alto teor de polifenóis totais, flavonoides e taninos (Tabela 4).

Tabela 4: Caracterização fitoquímica quantitativa do extrato vegetal da casca da *A.colubrina*.

	Polifenóis totais (equivalentes de ácido gálico/ %)	Flavonoides (equivalentes de quercetina/ %)	Taninos Condensados (equivalentes de catequina/ %)
Extrato da <i>A.colubrina</i>	53,18	0,28	8,73

A identificação de polifenóis totais, flavonoides e taninos corrobora os achados de Gomes de Melo et al. [39] e Campos et al. [40].

A caracterização fitoquímica das espécies vegetais para determinação dos grupos de metabólitos secundários é considerada uma abordagem fundamental, visto que tais espécies dispõem de uma rica fonte de substâncias que podem ser úteis no desenvolvimento de formas terapêuticas [41]. O conhecimento dos constituintes químicos das plantas também é útil para a síntese de substâncias químicas complexas [42].

O alto teor de compostos fenólicos encontrados pode ser o responsável pelo potencial antifúngico do extrato de *A.colubrina*. Tem sido sugerido que estas substâncias são capazes de causar instabilidade metabólica em *C. albicans* e destruir a atividade enzimática de proteossomas, contribuindo assim para a redução da taxa de crescimento dos microorganismos bem como a formação e maturação de biofilme [43].

Os taninos fazem parte do grupo de compostos fenólicos e possuem atividade antimicrobiana comprovada devido a capacidade de precipitar proteínas [44], propiciando a inativação de adesinas, enzimas, ou o transporte de proteínas no envelope celular, interferindo no transporte de soluto, ou ainda diminuindo a disponibilidade de íons metálicos essenciais ao

metabolismo dos microrganismos [45,46]. A quantidade de taninos na casca do caule de *A.colubrina* poderia variar de 3,21 a 11,07%, segundo Monteiro et al. [47], sendo assim, o teor de taninos encontrado nesse estudo está de acordo com a literatura. A pequena variação existente ocorre porque a concentração destes compostos depende da interação planta-ambiente, em resposta a diversos fatores biológicos e químicos, como concentração de nitrogênio e oxigênio no solo [48].

Foram encontrados, embora em menor quantidade, flavonoides, que também compõem o grupo de compostos fenólicos [49]. Esse metabólito secundário também pode ser associado a ação antifúngica encontrada nesse estudo para o extrato de *A.colubrina* porque já foi demonstrado na literatura o potencial antifúngico de flavonoides [49-51].

Perfil térmico

A curva TG do extrato *A.colubrina*, mostrou a ocorrência de três etapas de decomposição térmica e as curvas DSC do extrato mostraram que os processos térmicos ocorreram no intervalo de temperatura entre 52,37 a 195,52°C (Fig. 10).

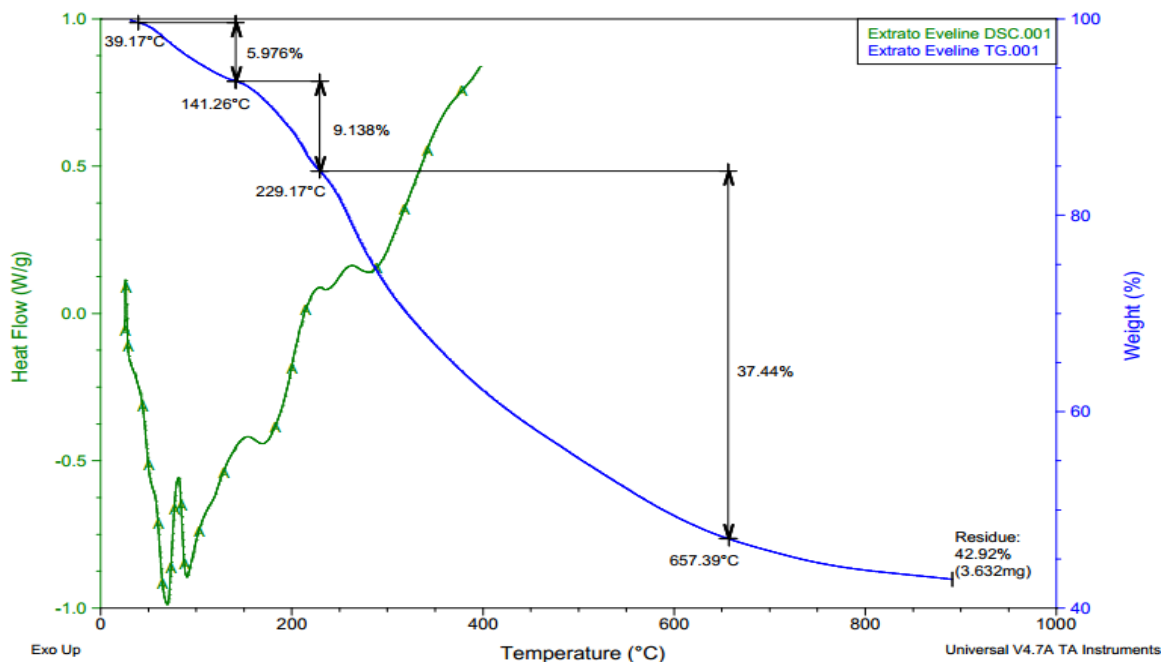


Figura 10: Curvas TG e DSC. Razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹. Temperaturas de 25 a 900 °C, para TG e de 25 a 400 °C para DSC.

A primeira etapa da TG ocorreu numa faixa de temperatura de 39,17 a 141,26°C, representando a perda de massa da amostra em aproximadamente 5,97%. Essa etapa foi

atribuída à perda de água e de alguns produtos voláteis da amostra. Esse teor de umidade está de acordo com o preconizado pela Farmacopeia Brasileira, esta estabelece para o controle de material vegetal um limite de 14% como valor máximo aceitável de umidade. Segundo Costa et al. [52], a TG é uma eficaz técnica para determinar o teor de umidade da planta e com estes resultados, é possível estabelecer parâmetros físicos para a secagem eficiente e boa conservação do material.

A segunda etapa ocorreu dentro de um intervalo de temperatura de 141,26 a 229,17 °C, possuindo uma perda de massa de 9,13%, correspondendo à primeira etapa de decomposição do extrato. A perda de massa mais significativa do extrato foi observada entre as temperaturas de 229,17°C e 657,39°C, com perda de 37,44%. Este evento provavelmente está relacionado com os metabólitos presentes na planta, já identificados como taninos e flavonoides.

Na curva DSC, foi observado um pico endotérmico em 69,96°C, que pode estar relacionado à vaporização da amostra, com perda de água e de constituinte voláteis da amostra. Os processos de decomposição começam acima de 195,52°C, os quais possivelmente se referem à decomposição inicial de metabólitos secundários presente na amostra como flavonoides, taninos entre outros [52]. Essa temperatura elevada para início da decomposição dos compostos presentes na planta sugerem uma boa estabilidade do extrato vegetal.

Segundo Oliveira et al. [53], os dados obtidos por análise térmica estão diretamente relacionados com a qualidade final de um produto farmacêutico, seja quanto à eficácia terapêutica do medicamento ou à estabilidade do mesmo ao longo do prazo de validade. A TG é utilizada para medir a variação de massa em função da temperatura em uma atmosfera controlada sob um programa de aquecimento. A DSC é utilizada para medir a diferença de fluxo de calor entre uma substância e um material de referência em função de um programa de aquecimento ou resfriamento. Todavia, algumas dificuldades são encontradas na obtenção de picos reprodutíveis de extratos de plantas nas curvas de DSC. Isso ocorre pelo fato de que esses extratos são uma mistura de substâncias que interagem entre si, na matriz vegetal. Além disso, muitas vezes os produtos de degradação são formados em diferentes concentrações devido a vários fatores, como a forma e imperfeições das partículas, perda de produtos gasosos e a taxa de aquecimento da amostra. Além do que, as impurezas presentes em extratos de plantas, tem um efeito direto sobre a largura dos picos obtidos no processo endotérmico [52,54].

Toxidez

O extrato de *A.colubrina* apresentou toxidez equivalente a 25% em relação ao controle positivo, no ensaio de hemólise (Tabela 5).

Tabela 5: Leitura visual da hemólise das suspensões de hemácias testadas com extrato liofilizado de *Anadenanthera colubrina* Vell. Brenan. Utilizou-se como referência: – (0% de hemólise), +(25% de hemólise, ou abaixo de 25%), ++ (50% de hemólise), +++ (75% de hemólise).

Concentrações (mg/mL)	Absorbância	Intensidade de hemólise
4	0,505	+
2	0,339	+
1	0,156	+
0,5	0,043	+
0,25	0,021	+
<i>Liquido de Turk</i> <i>(controle positivo)</i>	1,757	++++

Nenhuma das concentrações testadas chegou a ser a concentração citotóxica efetiva 50% (EC50), ou seja, capaz de hemolisar 50% de uma suspensão a 4% de eritrócitos [55]. Outros estudos *in vitro* devem ser realizados a fim de avaliar a biocompatibilidade do extrato vegetal de *A.colubrina* mimetizando as condições biológicas da mucosa oral bem como ensaios *in vivo*. Apesar das plantas já serem utilizadas na medicina tradicional, os ensaios de toxidez são fundamentais, uma que as plantas podem apresentar toxidez de acordo com a utilização, com o tempo de tratamento e com a forma de preparo do medicamento.

CONCLUSÃO

O extrato hidroalcoólico da casca da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan apresentou atividade fungistática frente às cepas estudadas, ação sobre a parede celular fúngica e sinergismo com a nistatina. O extrato exibiu alto teor de polifenóis totais e boa estabilidade térmica. Novos estudos devem ser realizados a fim de compreender os

mecanismos de ação envolvidos na atividade antifúngica do extrato vegetal de *A.colubrina* com vistas à produção de um novo medicamento para tratamento de candidose oral.

AGRADECIMENTOS

Aos Laboratórios Labdem/UEPB, Certbio/UEPB e CETENE.

REFERÊNCIAS

1. Li YY, Chen WY, Li X, Li HB, Li HQ, Li W et al. (2013). Asymptomatic oral yeast carriage and antifungal susceptibility profile of HIV-infected patients in Kunming, Yunnan Province of China. *BMC Infec Dis* 13(46):2-9.
2. Williams D, Lewis M (2011). Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *J Oral Microbiol* 3:1-11.
3. Almeida LFD, Cavalcanti YW, Viana WP, Lima EO (2010). Screening da atividade antifúngica de óleos essenciais sobre *Candida albicans*. *Rev Bras Ciênc Saúde* 14(4): 51-56.
4. Wakiec R, Prasad R, Morschhäuser J, Barchiesi F, Borowski E, Milewski (2007). Voriconazole and multidrug resistance in *Candida albicans*. *Mycoses* 50: 109-115.
5. Lewis, RE (2011). Current concepts in antifungal pharmacology. *Mayo Clin Proc* 86:805–817.
6. Zotchev SB (2003). Polyene macrolide antibiotics and their applications in human therapy. *Curr Med Chem* 10: 211-223.
7. Shapiro RS, Robbins N, and Cowen, LE (2011). Regulatory Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease. *Microbiol. Mol Biol Rev* 75(2): 213-267.
8. Abad MJ, Ansuategui M, Bermejo P (2007). Active antifungal substances from natural sources. *J Org Chem* 2:116-145.
9. Oliveira KS, Oliveira KS, Aloufa M (2012). Ahmed Ibrahim. Influência de substratos na germinação de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan em condições de casa de vegetação. *Rev. Árvore* 36(6): 1073-1078 .

10. Albuquerque UP, Medeiros PM, Monteiro JM, Lins Neto EMFL, Gomes de Melo J, Santos JP (2007). Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *J Ethnopharmacol* 114(3): 325–354.
11. Medeiros PM, Ladio AH, Albuquerque UP (2013). Patterns of medicinal plant use by inhabitants of Brazilian urban and rural areas: A macroscale investigation based on available literature. *J Ethnopharmacol* 150(2): 729–746.
12. Pedone-Bonfim MV, Lins MA, Coelho IR, Santana AS, Silva FS, Maia LC (2013). Mycorrhizal technology and phosphorus in the production of primary and secondary metabolites in cebil (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan) seedlings. *J Sci Food Agric*. 93(6):1479-1484.
13. Damascena NP, Souza MT, Almeida AF, Cunha RS, Damascena NP, Curvello RL et al. (2014). Antioxidant and orofacial anti-nociceptive activities of the stem bark aqueous extract of *Anadenanthera colubrina* (Velloso) Brenan (Fabaceae). *Nat Prod Res*: 28(10): 753-756.
14. Pessoa WS, Estevão LR, Simões RS, Barros ME, Mendonça Fde S, Baratella-Evêncio L, Evêncio-Neto J (2012). Effects of angico extract (*Anadenanthera colubrina* var. cebil) in cutaneous wound healing in rats. *Acta Cir Bras* 27(10):655-70.
15. Trentin DS, Silva DB, Amaral MW, Zimmer KR, Silva MV, Lipês NP et al (2013). Tannins Possessing Bacteriostatic Effect Impair *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion and Biofilm Formation. *PloS One* 8 (6): 1-13.
16. Rocha EALSSR, Carvalho AVOR, Andrade SRA, Medeiros ACD, Trovão DMBM, Costa EMMB (2013). Potencial antimicrobiano de seis plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 34(3): 351-355.
17. Silva CR, Oliveira LD, Leão MV, Jorge AO (2014). *Candida* spp. adherence to oral epithelial cells and levels of IgA in children with orthodontic appliances. *Braz Oral Res* 28(1): 28-32.
18. Lima RF, Alves EP, Rosalen PL, Ruiz ALCG, Duarte, MCT, Góes VFF et al (2014). Evid Based Complement Alternat Med 2014: 1-7.
19. Odds FC (2003). Synergy, antagonism and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chem* 52(1): 1.
20. Chandra S, Mejia EG (2004). Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Quinone Reductase Activity of an Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in Comparison to

- Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. *J Agric Food Chem* 52(1):3583–3589.
21. Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem* 91(3): 571–577.
22. Makkar HPS, Blümmel M, Borowy NK, Becker K (1993). Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *J Sci Agric* 61: 161-165.
23. Luize PS, Tiunan TS, Morello LG, Maza PK, Nakamura TU, Dias Filho BP et al. (2005). Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Rev Bras Cienc Farm* 41(1): 85-94.
24. Aligiannis N, Kalpotzakis E, Mitaku S, Chinou IB (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J Agric Food Chem* 40: 4168-4170.
25. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 1027-1031.
26. Tanaka JCA, Da Silva CC, Dias Filho BP, Nakamura CV, De Carvalho JE, Foglio, MA (2005). Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). *Quím Nova* 28: 834-837.
27. Frost DJ, Brandt KD, Cugier D, Goldman RJ (1995). A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. *J Antibiot* 48: 306-310.
28. Bowman SM, Free SJ (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays* 28(8):799-808.
29. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, De Melo NT (2002). *Tratado de micologia médica*. Sarvier, São Paulo:1104p.
30. Chen SH, Scheng CQ, Xu XH, Jiang YY, Zhang WN, He (2007). Identification of Y118 Amino Acid Residue in *Candida albicans* Sterol 14a-Demethylase Associated with the Enzyme Activity and Selective Antifungal Activity of Azole Analogues. *Biol Pharm Bull* 30(7): 1246—1253.
31. Moyes DL, Naglik JR (2011). Mucosal Immunity and *Candida albicans* Infection. *Clin Dev Immunol* 2011:1-9.

32. Alves LA, Freires A, Pereira TM, Souza A, Lima O, Castro RD (2013). Effect of *Schinus terebinthifolius* on *Candida albicans* growth kinetics, cell wall formation and micromorphology. **Acta Odontol Scand** 71(304): 965-71.
33. Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH (2004). Combination Antifungal Therapy. **J Antimicrob Chemother** 48(3):693-715.
34. Castro RD, Lima EO, Freires IA, Alves LA (2013). Combined effect of *Cinnamomum zeylanicum* blume essential oil and nystatin on *Candida albicans* growth and micromorphology. **Rev Ciênc Méd Biol** 12(2): 149-156.
35. Van Vuuren SF, Suliman S, Viljoen AM (2009). The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. **Lett Appl Microbiol** 48(4): 440-6.
36. Estrella-cuenca M (2004). Combinations of antifungal agents in therapy—what value are they? **J Antimicrob Chemother** 54(5): 854-869.
37. Rukayadi Y, Lee K, Lee M, Yong D, Hwang JK (2009). Synergistic anticandidal activity of xanthorrhizol in combination with ketoconazole or amphotericin B. **FEMS Yeast Res** 9(8): 1302–1311.
38. Andes D, Forrest A, Lepak A, Nett J, Marchillo K, Lincoln L (2006). Impact of antimicrobial dosing regimen on evolution of drug resistance in vivo: fluconazole and *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents Chemother** 50:2374-2383.
39. Gomes de Melo J, de Sousa Araújo TA, Almeida TN, Castro V, Lyra de Vasconcelos CD, do Desterro Rodrigues M et al (2010). Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. **Molecules** 15(12): 8534-8542.
40. Campos VAC, Perina FJ, Alves E, Sartorelli J, Moura A, Oliveira DF (2014). *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan produces steroidal substances that are active against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler and that may bind to oxysterol-binding proteins. **Pest Manag Sci**.
42. Yadav RNS, Agarwala M (2011). Phytochemical analysis of some medicinal plants. **J Phytol** 3(12): 10-14.
43. Evensen NA, Braun P C (2009). The effects of tea polyphenols on *Candida albicans*: inhibition of biofilm formation and proteasome inactivation. **Can J Microbiol** 55(9): 1033–1039.

44. Monteiro JM, Lins Neto EMF, Amorim ELC, Strattmann RR, Araujo EL, Albuquerque UP (2005). Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpáticas da caatinga. **Rev Árvore** 29: 999-1005.
45. Loquercio AP, Battistin A, Vargas AC, Henzel A and Witt NM (2005). Antibacterial activity of hydro-alcoholic extract leaves of jambolan (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Cienc Rural** 35: 371-376.
46. Samy RP, Gopalakrishnakone (2008). Therapeutic Potential of Plants as Anti-microbials for Drug Discovery. **eCAM** 7(3): 1-12.
47. Monteiro JM, Albuquerque UP, Lins Neto EMF, Araújo EL, Albuquerque MM, Amorim ELC (2006). The effects of seasonal climate changes in the caatinga on tannin levels in *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. and *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Rev Bras Farmacogn** 16 (3): 338-344.
48. Thilakarathna SH, Rupasinghe HPV (2013). Flavonoid Bioavailability and Attempts for Bioavailability Enhancement. **Nutrients** 5:3367-3387.
49. Orhan DD, Ozçelik B, Ozgen S, Ergun F (2009). Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. **Microbiol Res** 165(6): 496-504.
50. Lourenço RMDC, Melo PS, Almeida ABA (2013). Flavonoids as antifungal agents. **Antifungal Metabol Plants**: 283-300.
51. Okoth DA, Chenia HY, Koorbanally NA (2013). Antibacterial and antioxidant activities of flavonoids from *Lannea alata* (Engl.) Engl. (Anacardiaceae). **Phytochem Lett** 6: 476–481.
52. Costa RS, Negrão CAB, Camelo SRP, Ribeiro-Costa RM, Barbosa WLR, Costa CEF, Silva Júnior JOC (2013). Investigation of thermal behavior of *Heliotropium indicum* L. lyophilized extract by TG and DSC. **J Therm Anal Calorim**: 111(3):1959–1964.
53. Oliveira MA, Yoshida MI, Gomes ECL (2011). Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria Farmacêutica. **Quim Nova** 34(7): 1224-1230.
54. Fernandes FHA, Santana CP, Santos RL, Correia LP, Conceição MM, Macêdo RO, Medeiros ACD (2013). Thermal characterization of dried extract of medicinal plant by DSC and analytical techniques. **J Therm Anal Calorim** 113(2): 443-447.
55. Schulz D, Pereira MA, Batista CRV (2005). Obtenção de um extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* e sua atividade antimicrobiana e hemolítica. **Alim Nutr** 16(3): 233-237.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo demonstram o potencial antifúngico da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan contra cepas padrão de *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e fungicida contra isolados clínicos de *Candida albicans*. Quanto ao possível alvo de ação do extrato vegetal sobre *Candida albicans*, foi possível constatar a ação do extrato sobre a parede celular fúngica o que pode representar uma alternativa mais seletiva aos antifúngicos comumente utilizados. Observou-se também através de microscopia, a considerável redução de células viáveis após o tratamento com o extrato vegetal e a modificação da parede celular. A interação do extrato da *A.colubrina* com a nistatina (antifúngico padrão) demonstrou-se a ação sinérgica entre as substâncias testadas (extrato vegetal e nistatina). Na cinética microbiana, observou-se a manutenção do sinergismo ao longo do tempo com redução estatisticamente significativa do número de células viáveis. A caracterização fitoquímica revelou um alto teor de compostos fenólicos, que possivelmente são responsáveis pelo potencial antifúngico do extrato vegetal de *A.colubrina*. O perfil térmico do extrato vegetal foi traçado, obtendo-se três etapas de decomposição térmica em TG e temperatura elevada para início da decomposição dos compostos em DSC, o que pode sugerir boa estabilidade. As cinco concentrações do extrato vegetal testadas não apresentam toxidez. Novos estudos devem ser realizados a fim de compreender os mecanismos de ação envolvidos na atividade antifúngica do extrato vegetal de *A.colubrina* com vistas à produção de um novo medicamento para tratamento de candidose oral.

6. REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

- ABAD, M. J.; ANSUATEGUI, M.; BERMEJO, P. Active antifungal substances from natural sources. *ARKIVOC: Online Journal of Organic Chemistry*, v. 2, p.116-145, 2007.
- ALBUQUERQUE, U.P.; MEDEIROS, P.M.; ALMEIDA, A.L.S.; MONTEIRO, J.M.; LINS NETO, E.M.F.; MELO, J.B.; SANTOS, J.P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology*, v.114, n.3, p.325-354, 2007.
- ALIGIANNIS N, KALPOTZAKIS E, MITAKU S, CHINOUB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, n.9, p.4168-4170, 2001.
- ALMEIDA, L.F.D.; CAVALCANTI, Y.W.; VIANA, W.P.; LIMA, E.O. Screening da atividade antifúngica de óleos essenciais sobre *Candida albicans*. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, v.14, n.4, p.51-56, 2010.
- ANDES, D.; FORRES, A.; LEPAK, A.; NETT, K.; MARCHILLO, K.; LINCOLN, L. Impact of Antimicrobial Dosing Regimen on Evolution of Drug Resistance In Vivo: Fluconazole and *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.50, n.7, p.2374-2383, 2006.
- ASMUNDSDÓTTIR, L.R.; ERLENDSDÓTTIR, H.; AGNARSSON, B.A.; GOTTFREDSSON, M. The importance of strain variation in virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*: results of a blinded histopathological study of invasive candidiasis. *Clinical microbiology and infection*, v.15, n.6, p.576-585, 2009.
- AZIZ, A.N.; IBRAHIM, H.; ROSMY SYAMSIR, D.; MOHTAR, M.; VEJAYAN, J.; AWANG, K. Antimicrobial compounds from *Alpinia conchigera*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.145, n.3, p.:798-802, 2013.
- BARBEDO, L.S.; SGARBI, D.B.G. Candidiasis. *DST-Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*, v.22, p.22-38, 2010.
- BLANKENSHIP, J.R.; MITCHELL, A.P. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current Opinion in Microbiology*, v.9, n.6, p.588-594, 2006.
- BOWMAN, S.M.; FREE, S.J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays*, v.28, n.8, p.799-808, 2006.
- CAMPOS, V.A.; PERINA, F.J.; ALVES, E.; SARTORELLI, J.; MOURA, A.M.; OLIVEIRA, D.F. *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan produces steroidal substances that

are active against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler and that may bind to oxysterol-binding proteins. **Pest Management Science**, 2014.

CANNON, R.D.; LAMPING, E.; HOLMES, A.R.; NIMI, K.; BARET, P.V.; KENIYA, M.V.; TANABE, K.; NIMI, M.; GOFFEAU, A.; MONK, B.C. Efflux-Mediated Antifungal Drug Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.22, n.2, p.291-321, 2009.

CASTRO, R.D.; LIMA, E.O.; FREIRES, I.A.; ALVES, L.A. Combined effect of *Cinnamomum zeylanicum* blume essential oil and nystatin on *Candida albicans* growth and micromorphology. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.12, n.2, p.149-156, 2013.

CHANDRA, S.; MEJIA, E. G. Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Quinone Reductase Activity of an Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in Comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n.1, p 3583–3589, 2004.

CHEN, S.H.; SCHENG, C.Q.; XU, X.H.; JIANG, Y.Y.; ZHANG, W.N.; H.E. Identification of Y118 Amino Acid Residue in *Candida albicans* Sterol 14a-Demethylase Associated with the Enzyme Activity and Selective Antifungal Activity of Azole Analogues. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.30, n.7, p.1246—1253, 2007.

COSTA, R.S.; NEGRÃO, C.A.B.; CAMELO, S.R.P.; RIBEIRO-COSTA, R.M.; BARBOSA, W.L.R.; COSTA, C.E.F.; SILVA JÚNIOR, J.O.C. Investigation of thermal behavior of *Heliotropium indicum* L. lyophilized extract by TG and DSC. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.111, n.3, p1959–1964, 2013.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p.564-582. 1999.

CROY, S.R.; KNOWN, G.S. The effects of pluronic block aggregation state of nystatin. **Journal Controlled Release**, v.95, n.2, p.161-171, 2004.

DAMASCENA, N.P.; SOUZA, M.T.; ALMEIDA, A.F.; CUNHA, R.S.; DAMASCENA, N.P.; CURVELLO, R.L.; LIMA, A.C.; ALMEIDA, E.C.; SANTOS, C.C.; DIAS, A.S.; PAIXÃO, M.S.; SOUZA, L.M.; QUINTANS JÚNIOR, L.J.; ESTEVAM, C.S.; ARAUJO, BS. Antioxidant and orofacial anti-nociceptive activities of the stem bark aqueous extract of *Anadenanthera colubrina* (Velloso) Brenan (Fabaceae). **Natural Product Research**, v.28, n.10, p.753-756, 2014.

DIAZ, P.I.; XIE, Z.; SOBUE, T.; THOMPSON, A.; BIYIKOGLU, B.; RICKER, A.; IKONOMOU, L.; BAGTZOGLU, A.D. Synergistic Interaction between *Candida albicans* and Commensal Oral Streptococci in a Novel in vitro Mucosal Model. **Infection and Immunity**, 80(2): 620–632, 2012.

- ESTRELLA-CUENCA, M. Combinations of antifungal agents in therapy—what value are they? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 5, p.854-869, 2004.
- EVENSEN, N.A.; BRAUN, P.C. The effects of tea polyphenols on *Candida albicans*: inhibition of biofilm formation and proteasome inactivation, **Canadian Journal of Microbiology**, v.55, n.9, p.1033–1039, 2009.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo: Atheneu; 1988.
- FERNANDES, F.H.A.; SANTANA, C.P.; SANTOS, R.L.; CORREIRA, L.P.; CONCEIÇÃO, M.M.; MACÊDO, R.O.; MEDEIROS, A.C.D. Thermal characterization of dried extract of medicinal plant by DSC and analytical techniques. **Journal of Thermal Analysis Calorimetry**, v.113, n.2, p.443-447, 2013.
- FINKEL, J.S.; MITCHELL, A.P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. **Microbiology**, v.9, n.2, p.109-118, 2011.
- FROST, D.J.; BRANDT, K.D.; CUGIER, D.; GOLDMAN, R.J. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. **The Journal of Antibiotics**, v.48, n.4, p.306-310, 1995.
- GOMES DE MELO, J.; ARAÚJO, T.A.S.; ALMEIDA, T.N.; CASTRO, V.; CABRAL, L.V.D.; RODRIGUES, M.D.; NASCIMENTO, S.C.; AMORIM, E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. **Molecules**, v.15, n.12, p. 8534-42, 2010.
- GOWS, N.A.R.; FRANK, L.; VAN DE VEERDONK, BROWN, A.J.P.; NETEA, M.G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews Microbiology**, v.10, n.2, p.112-122, 2013.
- HÁ, J.F.; ITALIANO, C.M.; HEALTH, C.H.; SHIH, S.; REA, S.; WOOD, F.M. Candidemia and invasive candidiasis: a review of the literature for the burns surgeon. **Burns**, v.37, p.181-195, 2011.
- HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p. 1027-1031, 2002.
- HUSSAIN, M.S.; FAREED, S.; ANSARI, S.; RAHMAN, M.A.; AHMAD, I.Z.; SAEED, M. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v.4, n.1, p.10-20, 2012.

- IRSHAD, SHREAZ. S.; MANZOOR, N.; KHAN, L.A.; RIZVI, M.M. Anticandidal activity of *Cassia fistula* and its effect on ergosterol biosynthesis. **Pharmaceutical Biology**, v.49, n.7, p.:727-733, 2011.
- JOHNSON, M.D.; MacDougall, C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PERFECT, J.R.; REX, J.H. Combination Antifungal Therapy. **Antimicrobial Agentes of Chemotherapy**, v.48, n.3, p.693-715, 2004.
- JOTHY, S.L.; ZAKARIAH, Z.; CHEN, Y.; SASIDHARAN, S. In vitro, in situ and in vivo studies on the anticandidal activity of *Cassia fistula* seed extract. **Molecules**, v.17, n.6, p.:6997-7009, 2012.
- KOLACZKOWSKI, M.; KOLACZKOWSKA, A.; SRODA, K.; RAMALHETE, C.; MICHALAK, K.; MULHOVO, S.; FERREIRA, M.J. Substrates and modulators of the multidrug transporter Cdr1p of *Candida albicans* in antifungal extracts of medicinal plants. **Mycoses**, v.53, n.4, p.:305-310, 2010.
- KOTHAVADE, R.J.; KURA, .M.M.; VALAND, A.G.; PANTHAKI, M.H. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. **Journal of Medical Microbiology**, v.59, p.873-880, 2010.
- KUMAMOTO, C.A. Inflammation and gastrointestinal *Candida* colonization. **Current Opinion in Microbiology**, v.14, n.4, p.386–391, 2011.
- LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; DE MELO, N.T. Tratado de micologia médica. Sarvier, São Paulo, 1104p, 2002.
- LEWIS, R.E. Current concepts in antifungal pharmacology. **Mayo Clinic Proceedings**, v.86, n.8, p.805–817, 2011.
- LI, Y.Y.; CHEN, W.Y.; LI, X.; LI, H.B.; LI, H.Q.; LI, W. et al. Asymptomatic oral yeast carriage and antifungal susceptibility profile of HIV-infected patients in Kunming, Yunnan Province of China. **BMC Infectious Diseases**, v.13, n.46, p.2-9. 2013.
- LIMA, R.F.; ALVES, E.P.; ROSALEN, P.L.; RUIZ, A.L.T.G.; DUARTE, M.C.T.; GÓES, V.F.F.; MEDEIROS, A.C.D.; PEREIRA, J.V.P.; GODOY, G.P.; COSTA, E.M.M.B.C. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2014.
- LOPEZ-RIBOT, J.L. *Candida albicans* biofilms: more than filamentation. **Current Biology**, v.15, n.2, p.453-455, 2005.
- LOQUERCIO, A.P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A.C.; HENZEL, A.; WITT, N.M. Antibacterial activity of hydro-alcoholic extract leaves of jambolan (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, v.35, n.2, p.371-376, 2005.

- LOURENÇO, R.M.D.C.; MELO, P.S.; ALMEIDA, A.B.A. Flavonoids as antifungal agents. **Antifungal Metabolites from Plants**, p.283-300, 2013.
- LUIZE, P.S.; TIUMAN, T.S.; MORELLO, L.G.; MAZA, P.K.; NAKAMURA, T.U.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; MELLO, J.C.P.; NAKAMURA, C.V. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania* (L.) *Amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.1, p.85-94, 2005.
- MADHUMITHA, G.; SARAL, A.M. Preliminary phytochemical analysis, antibacterial, antifungal and anticandidal activities of successive extracts of *Crossandra infundibuliformis*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.4, n.3, p.: 192-195, 2011.
- MAKKER, H.P.S.; BLÜMMEL, M.; BOROWY, N.K.; BECKER, K. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. **Journal Science of Food and Agriculture**, v.61, p.161-165, 1993.
- MAYER FL, WILSON D, HUBE B: *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v.4, n.2, p.119–128, 2013.
- MCMANUS, B.A.; COLEMAN, D.C. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. **Infection, Genetics and Evolution**, v.21, p.166–178, 2014.
- MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOULMA, O. G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v.91, n. 3, p 571–577, 2005.
- MEDEIROS, P.M.; LADIO, A.H.; ALBUQUERQUE, U.P. Patterns of medicinal plant use by inhabitants of Brazilian urban and rural areas: A macroscale investigation based on available literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v.150, n.2, p. 729–746, 2013.
- MOHAN, V.; BALLAL, M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.25, n.4, p.208-210, 2008.
- MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; LINS NETO, E.M.F.; ARAÚJO, E.L.; ALBUQUERQUE, M.M.; AMORIM, E.L.C. The effects of seasonal climate changes in the caatinga on tannin levels in *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. and *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.3, p.338-344, 2006.
- MONTEIRO, J.M.; LINS NETO, E.M.F.; AMORIM, E.L.C.; STRATTMANN, R.R.; ARAUJO, E.L.; ALBUQUERQUE, U.P. Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpáticas da caatinga. **Revista Árvore**, v.29, n.6, p.999-1005, 2005.
- MOYES, D.L.; NAGLIK, J.R. Mucosal Immunity and *Candida albicans* Infection. **Clinical and Developmental Immunology**, v.48, n.3, p.693-715, 2004.

- OKOTH, D.A.; CHENIA, H.Y.; KOORBANALLY, N.A. Antibacterial and antioxidant activities of flavonoids from *Lannea alata* (Engl.) Engl. (Anacardiaceae). **Phytochemistry Letters**, v.6, n.3, p.476-481, 2013.
- OLIVEIRA, K.S.; OLIVEIRA, K.S.; ALOUFA, M.A.I. Influência de substratos na germinação de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan em condições de casa de vegetação. **Revista Árvore**, v.36, n.6, p.1073-1078, 2012.
- OLIVEIRA, M.A.; CARVALHO, L.P.; GOMES, M.S.; BACELLAR, O.; BARROS, T.F.; CARVALHO, E.M. Microbiological and immunological features of oral candidiasis. **Microbiology and Immunology**, v.51, n.8, p.713-719, 2007.
- OLIVEIRA, M.A.; YOSHIDA, M.I.; GOMES, E.C.L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria Farmacêutica. **Química Nova**, v. 34, n.7, p.1224-1230, 2011.
- ORHAN, D.D.; OZÇELIK, B.; OZGEN, S.; ERGUN, F. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. **Microbiological Research**, v.165, n.6, p. 496-504, 2010.
- PEDONE-BONFIM, M.V.; LINS, M.A.; COELHO, I.R.; SANTANA, A.S.; SILVA, F.S.; MAIA, LC. Mycorrhizal technology and phosphorus in the production of primary and secondary metabolites in cebil (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan) seedlings. **Journal Science of Food and Agriculture**, v.93, n.6, p. 1479-1484, 2013.
- PESSOA, W.S.; ESTEVÃO, L.R.; SIMÕES, R.S.; BARROS, M.E.; MENDONÇA, F.S.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; EVÊNCIO-NETO, J. Effects of angico extract (*Anadenanthera colubrina* var. cebil) in cutaneous wound healing in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.27, n.10, p.655-670, 2012.
- PINTO, P.M.; WEIKERT-OLIVEIRA, R.C.B.; LYON, J.P. In vitro antifungal susceptibility of clinical isolates of *Candida* spp. obtained from patients with different predisposing factors to candidosis. **Microbiological Research**, v.163, n.5, p.579-585. 2008.
- ROCHA, E.A.L.S.S.R.; CARVALHO, A.V.O.R.; ANDRADE, S.R.A.; MEDEIROS, A.C.D.; TROVÃO, D.M.B.M.; COSTA, E.M.M.B. Potencial antimicrobiano de seis plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada**, v.34, n.3, p. 351-355, 2013.
- ROCHA, E.A.L.S.S.R.; CARVALHO, A.V.O.R.; ANDRADE, S.R.A.; MEDEIROS, A.C.D.; TROVÃO, D.M.B.M.; COSTA, E.M.M.B. Potencial antimicrobiano de seis plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada**, v.34, n.3, p.351-355, 2013.

- ROUIS, Z.; ABID, N.; KOUDJA, S.; YANGUI, T.; ELAISSI, A.; CIONI, P.L.; FLAMINI, G.; AOUNI, M. Evaluation of the cytotoxic effect and antibacterial, antifungal, and antiviral activities of *Hypericum triquetrifolium* Turra essential oils from Tunisia. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.13, n.24, p.:1-13, 2013.
- RUKAYADI, Y.; LEE, K.; LEE, M.; YOUNG, D.; HWANG, J.Hwang^{1,3}Synergistic anticandidal activity of xanthorrhizol in combination with ketoconazole or amphotericin B. **FEMS Yeast Research**, v.9, n.8, p.1302–1311, 2009.
- SADOWSKA B, BUDZYŃSKA A, WIĘCKOWSKA-SZAKIEL M, PASZKIEWICZ M, STOCHMAL A, MONIUSZKO-SZAJWAJ B, KOWALCZYK M, RÓŻALSKA B. New pharmacological properties of *Medicago sativa* and *Saponaria officinalis* saponin-rich fractions addressed to *Candida albicans*. **Journal of Medical Microbiology**, v.63, n.8, p.:1076-1086, 2014.
- SAMY, R.P.; GOPALAKRISHNAKONE. Therapeutic Potential of Plants as Anti-microbials for Drug Discovery. **eCAM Advance Access published**, v.7, n.3, p.1-12, 2008.
- SAVITHRAMMA, N.; M. RAO, L.; SUHRULATHA, D. Screening of Medicinal Plants for Secondary Metabolites. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v.8, n. 3, p.579-584, 2011.
- SCHEID, L.; MARIO, D.; LOPES, P.; LORETO, E.; LINARES, C.; SANTURIO, J.; ALVES, S. *Candida dubliniensis* does not show phospholipase activity: true or false? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.2, p.205-206, 2010.
- SCHULZ, D.; PEREIRA, M.A.; BATISTA, C.R.V. Obtenção de um extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* e sua atividade antimicrobiana e hemolítica. **Alimentos e Nutrição**, v.16, n.3, p. 233-237, 2005.
- SHAPIRO, R.S.; ROBBINS, N.; COWEN, L.E. Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.75, n.2, p.213-267, 2011.
- SILVA, C.R.; OLIVEIRA, L.D.; LEÃO, M.V.; JORGE, A.O. *Candida* spp. adherence to oral epithelial cells and levels of IgA in children with orthodontic appliances. **Brazilian Oral Research**, v.28, n.1, p.28-32, 2014.
- SILVA, L.C.; SANDES, J.M.; PAIVA, M.M.; ARAÚJO, J.M.; FIGUEIREDO, R.C.; SILVA, M.V.; CORREIA, M.T. Anti-*Staphylococcus aureus* action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. **Natural Products Research**, v.27, n.16, p.1492-1496, 2013.

- SILVA-ROCHA, W.P.; LEMOS, V.L.; SVIDIZISNKI, T.I.; MILAN, E.P.; CHAVES, G.M. *Candida* species distribution, genotyping and virulence factors of *Candida albicans* isolated from the oral cavity of kidney transplant recipients of two geographic regions of Brazil. **BMC Oral Health**, v.14, n.1, p. , 2014.
- STOKES, C.; MORAN, G.P.; SPIERING, M.J.; COLE, G.T.; COLEMAN, D.C.; SULLIVAN, D.J. Lower filamentation rates of *Candida dubliniensis* contribute to its lower virulence in comparison with *Candida albicans*. **Fungal Genetics and Biology**, v.44, n.9, p.920–931, 2007.
- TANAKA, J.C.A.; DA SILVA, C.C.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V.; DE CARVALHO, J.E.; FOGGIO, M.A. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Química Nova**, v.28, p.834-837, 2005.
- THILAKARATHNA, S.H.; RUPASINGHE HPV. Flavonoid Bioavailability and Attempts for Bioavailability Enhancement. **Nutrients**, v.5, n.9, p.3367-3387, 2013.
- THOMPSON, R.D.; PATEL, P.K.; KIRKPATRICK, W.R.; WESTBROOK, S.D.; BERG, D.; ERLANDSEN, J.; REDDING, S.W.; PATTERSON, T.F. Oropharyngeal candidiasis in the era of antiretroviral therapy. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v.109, p.488–495, 2010.
- TRABULSI FILHO, F.A.; ANDRADE, K.C.S.; SILVA, E.C.; CASTRO, A.T.O.; BATISTA, M.C.A.; RIBEIRO, M.N.S.; AMARAL, F.M.M. Estudo de padronização de extratos de *anacardium occidentale* l. na pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos giardicidas. **Caderno de Pesquisa**, v.20, n.especial, p.7-15, 2013.
- TRABULSI FILHO, F.A.; ANDRADE, K.C.S.; SILVA, E.C.; CASTRO, A.T.O.; BATISTA, M.C.A.; RIBEIRO, N.S.; AMARAL, F.M.M. Estudo de padronização de extratos de *anacardium occidentale* na pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos giardicidas. **Caderno de Pesquisa**, v.20, n.especial, p.7-15, 2013.
- TRENTIN, D.S.; SILVA, D.B.; AMARAL, M.W.; ZIMMER, K.R.; SILVA, M.V.; LOPES, N.P.; GIORDANI, R.B.; MACEDO, A.J. Tannins Possessing Bacteriostatic Effect Impair *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion and Biofilm Formation. **PloS One**, v.8, n.6, p.1-13, 2013.
- TSAI, P.W.; CHEN, Y.T.; YANG, C.Y.; CHEN, H.F.; TAN, T.S.; LIN, T.W.; HSIEH, W.P.; LAN, C.Y. The role of Mss11 in *Candida albicans* biofilm formation. **Molecular genetics and genomics**, 2014.

- VAZQUEZ JA. Invasive fungal infections in the intensive care unit. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v.31, n.1, p.79-86, 2010.
- WAKIEC, R.; PRASAD, R.; MORSCHHAUSER, J.; BARCHIESI, F.; BOROWSKI, E.; MILEWSKI, S. Voriconazole and multiridrug resistance in *Candida albicans*. **Mycoses**, v.50, p.109-115, 2007.
- WANNMACHER, L; FERREIRA, M.B.C. Antifúngicos. Farmacologia Clínica para Dentistas. 3ª Edição Koogan: Rio de Janeiro, 2007.
- WILLIAMS, D.; LEWIS, M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. **Journal of Oral Microbiology**, v.3:5771, 2011.
- YADAV, R.N.S.; AGARWALA, M. Phytochemical analysis of some medicinal plants. **Journal of Phytology**, v.3, n.12, p.10-14, 2011.
- ZIJNGE, V.; VAN LEEUVEN, M.B.M.; DEGENER, J.E.; ABBAS, F.; THURNHEER, T.; GMÜR, R.; HARMSSEN, H.J.M.. Oral biofilm architecture on natural teeth. **PLoS One**, 2010.
- ZOMORODIAN, K.; HAGHIGHI, N.N.; RAJAEE, N.; PAKSHIR, K.; TARAZOOIE, B.; VOJDANI, M.; SEDAGHAT, F.; VOSOGHI, M. Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. **Medical Mycology**, v.49, n.2, p.208–211, 2011.
- ZOTCHEV, S.B. Polyene macrolide antibiotics and their applications in human therapy. **Current Medicinal Chemistry**, v.10, p.211-223, 2003.

7. ANEXO

7. ANEXO

NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA PLOS ONE

1. Format Requirements

PLOS ONE does not consider presubmission inquiries. All submissions should be prepared with the following files:

- Cover letter
- Manuscript, including tables and figure legends
- Figures (guidelines for preparing figures can be found at the Figure and Table Guidelines)

Prior to submission, authors who believe their manuscripts would benefit from professional editing are encouraged to use language-editing and copyediting services. Obtaining this service is the responsibility of the author, and should be done before initial submission. These services can be found on the web using search terms like "scientific editing service" or "manuscript editing service." Submissions are not copyedited before publication.

Submissions that do not meet the *PLOS ONE* Publication Criterion for language standards may be rejected.

Cover Letter

You should supply an approximately one page cover letter that:

- Concisely summarizes why your paper is a valuable addition to the scientific literature
- Briefly relates your study to previously published work
- Specifies the type of article you are submitting (for example, research article, systematic review, meta-analysis, clinical trial)
- Describes any prior interactions with PLOS regarding the submitted manuscript
- Suggests appropriate *PLOS ONE* Academic Editors to handle your manuscript (view a complete listing of our academic editors)
- Lists any recommended or opposed reviewers

Your cover letter should not include requests to reduce or waive publication fees. Should your manuscript be accepted, you will have the opportunity to include your requests at that time. See *PLOS ONE* Editorial Policy for more information regarding publication fees.

Manuscript Organization

PLOS ONE considers manuscripts of any length. There are no explicit restrictions for the number of words, figures, or the length of the supporting information, although we encourage a concise and accessible writing style. We will not consider monographs.

All manuscripts should be double-spaced and include line numbers and page numbers.

Manuscripts should begin with the ordered sections:

- Title
- Authors
- Affiliations
- Abstract
- Introduction and end with the sections of:
- Acknowledgments
- References
- Figure Legends
- Tables

Figures should not be included in the main manuscript file. Each figure must be prepared and submitted as an individual file. Find more information about preparing figures [here](#).

The title, authors, and affiliations should all be included on a title page as the first page of the manuscript file.

There are no explicit requirements for section organization between these beginning and ending sections. Articles may be organized in different ways and with different section titles, according to the authors' preference. In most cases, internal sections include:

- Materials and Methods
- Results
- Discussion
- Conclusions (optional)

PLOS ONE has no specific requirements for the order of these sections, and in some cases it may be appropriate to combine sections. Guidelines for individual sections can be found below.

Abbreviations should be kept to a minimum and defined upon first use in the text. Non-standard abbreviations should not be used unless they appear at least three times in the text.

Standardized nomenclature should be used as appropriate, including appropriate usage of species names and SI units.

Manuscript File Requirements

Authors may submit their manuscript files in Word (as .doc or .docx), LaTeX (as .pdf), or RTF format. Only RTF and .doc files can be used during the production process. Word files must not be protected.

LaTeX Submissions. If you would like to submit your manuscript using LaTeX, you must author your article using the *PLOS ONE* LaTeX template and BibTeX style sheet. Articles prepared in LaTeX may be submitted in PDF format for use during the review process. After acceptance, however, .tex files and formatting information will be required as a zipped file. Please consult our LaTeX guidelines for a list of what will be required.

Microsoft Word Submissions with Equations

If your manuscript is or will be in Microsoft Word and contains equations, you must follow the instructions below to make sure that your equations are editable when the file enters production.

1. Format display equations only in MathType (<http://www.dessci.com/en/products/mathtype/>).
2. Do not use Equations tools or Symbol font for any equation formatting. If your inline equations require special formatting, use MathType.
3. Do not use Graphic Objects.

If you have already composed your article in Microsoft Word and used its built-in equation editing tool, your equations will become unusable during the typesetting process. To resolve this problem, re-key your equations using MathType.

If you do not follow these instructions, PLOS will not be able to accept your file.

2. Guidelines for Standard Sections

Title

Manuscripts must be submitted with both a full title and a short title, which will appear at the top of the PDF upon publication if accepted. Only the full title should be included in the manuscript file; the short title will be entered during the online submission process.

The full title must be 250 characters or fewer. It should be specific, descriptive, concise, and comprehensible to readers outside the subject field. Avoid abbreviations if possible. Where appropriate, authors should include the species or model system used (for biological papers) or type of study design (for clinical papers).

Examples:

- Impact of Cigarette Smoke Exposure on Innate Immunity: A *Caenorhabditis elegans* Model
- Solar Drinking Water Disinfection (SODIS) to Reduce Childhood Diarrhoea in Rural Bolivia: A Cluster-Randomized, Controlled Trial

The short title must be 50 characters or fewer and should state the topic of the paper.

Authors and Affiliations

All author names should be listed in the following order:

- First names (or initials, if used),
- Middle names (or initials, if used), and
- Last names (surname, family name)

Each author should list an associated department, university, or organizational affiliation and its location, including city, state/province (if applicable), and country. If the article has been submitted on behalf of a consortium, all author names and affiliations should be listed at the end of the article.

This information cannot be changed after initial submission, so please ensure that it is correct.

To qualify for authorship, a researcher should contribute to all of the following:

1. Conception and design of the work, acquisition of data, or analysis and interpretation of data
2. Drafting the article or revising it critically for important intellectual content
3. Final approval of the version to be published

All persons designated as authors should qualify for authorship, and all those who qualify should be listed. Each author must have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Those who contributed to the work but do not qualify for authorship should be listed in the acknowledgments.

When a large group or center has conducted the work, the author list should include the individuals whose contributions meet the criteria defined above, as well as the group name.

One author should be designated as the corresponding author, and his or her email address or other contact information should be included on the manuscript cover page. This information will be published with the article if accepted.

Abstract

The abstract should:

- Describe the main objective(s) of the study
- Explain how the study was done, including any model organisms used, without methodological detail
- Summarize the most important results and their significance
- Not exceed 300 words

Abstracts should not include:

- Citations
- Abbreviations, if possible

Introduction

The introduction should:

- Provide background that puts the manuscript into context and allows readers outside the field to understand the purpose and significance of the study
- Define the problem addressed and why it is important
- Include a brief review of the key literature
- Note any relevant controversies or disagreements in the field

- Conclude with a brief statement of the overall aim of the work and a comment about whether that aim was achieved

Materials and Methods

This section should provide enough detail to allow suitably skilled investigators to fully replicate your study. Specific information and/or protocols for new methods should be included in detail. If materials, methods, and protocols are well established, authors may cite articles where those protocols are described in detail, but the submission should include sufficient information to be understood independent of these references.

We encourage authors to submit detailed protocols for newer or less well-established methods as Supporting Information. Further information about formatting Supporting Information files, can be found [here](#).

Methods sections of papers on research using human or animal subjects and/or tissue or field sampling must include required ethics statements. See the [Reporting Guidelines](#) for human research, clinical trials, animal research, and observational and field studies for more information.

Methods sections of papers with data that should be deposited in a publicly available database should specify where the data have been deposited and provide the relevant accession numbers and version numbers, if appropriate. Accession numbers should be provided in parentheses after the entity on first use. If the accession numbers have not yet been obtained at the time of submission, please state that they will be provided during review. They must be provided prior to publication. A list of recommended repositories for different types of data can be found [here](#).

Methods sections of papers using cell lines must state the origin of the cell lines used. See the [Reporting Guidelines](#) for cell line research for more information.

Methods sections of papers adding new taxon names to the literature must follow the [Reporting Guidelines](#) below for a new zoological taxon, botanical taxon, or fungal taxon.

Results, Discussion, and Conclusions

These sections may all be separate, or may be combined to create a mixed Results/Discussion section (commonly labeled "Results and Discussion") or a mixed Discussion/Conclusions section (commonly labeled "Discussion"). These sections may be further divided into subsections, each with a concise subheading, as appropriate. These sections have no word limit, but the language should be clear and concise.

Together, these sections should describe the results of the experiments, the interpretation of these results, and the conclusions that can be drawn. Authors should explain how the results relate to the hypothesis presented as the basis of the study and provide a succinct explanation of the implications of the findings, particularly in relation to previous related studies and potential future directions for research.

PLOS ONE editorial decisions do not rely on perceived significance or impact, so authors should avoid overstating their conclusions. See the *PLOS ONE* Publication Criteria for more information.

Acknowledgments

People who contributed to the work but do not fit the *PLOS ONE* authorship criteria should be listed in the acknowledgments, along with their contributions. You must ensure that anyone named in the acknowledgments agrees to being so named.

Funding sources should not be included in the acknowledgments, or anywhere in the manuscript file. You will provide this information during the manuscript submission process.

References

General guidelines

- Authors may cite any and all available works in the reference list.
- Authors may not cite unavailable and unpublished work, including manuscripts that have been submitted but not yet accepted (e.g., “unpublished work,” “data not shown”).
- If an article is submitted to a journal and also publicly available as a pre-print, the pre-print may be cited.
- If related work has been submitted to *PLOS ONE* or elsewhere, authors should include a copy with the submitted article as confidential supplementary information, for review purposes only.

- Authors should not state 'unpublished work' or 'data not shown,' but instead include those data as supplementary material or deposit the data in a publicly available database.
- Authors should not state 'unpublished work' or 'data not shown,' but instead include those data as supplementary material or deposit the data in a publicly available database.

Reference formatting

References must be listed at the end of the manuscript and numbered in the order that they appear in the text. In the text, citations should be indicated by the reference number in brackets. Journal name abbreviations should be those found in the NCBI databases. A number of reference software companies supply PLOS style files (e.g., Reference Manager, EndNote).

References should be formatted as follows:

- Published papers. Hou WR, Hou YL, Wu GF, Song Y, Su XL, et al. (2011) cDNA, genomic sequence cloning and overexpression of ribosomal protein gene L9 (rpL9) of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *Genet Mol Res* 10: 1576-1588. Note: Use of a DOI number for the full-text article is acceptable as an alternative to or in addition to traditional volume and page numbers.
- Accepted, unpublished papers. Same as above, but “In press” appears instead of the page numbers.
- Electronic journal articles. Huynen MMTE, Martens P, Hilderlink HBM (2005) The health impacts of globalisation: a conceptual framework. *Global Health* 1: 14. Available: <http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14>. Accessed 25 January 2012.
- Books. Bates B (1992) *Bargaining for life: A social history of tuberculosis*. Philadelphia: University of Pennsylvania Press. 435 p.
- Book chapters Hansen B (1991) New York City epidemics and history for the public. In: Harden VA, Risse GB, editors. *AIDS and the historian*. Bethesda: National Institutes of Health. pp. 21-28.
- Published media, not peer-reviewed. Examples: print or online newspapers and magazine articles. Fountain H (29 Jan 2014). For Already Vulnerable Penguins, Study Finds Climate

Change Is Another Danger. The New York Times. Available:<http://www.nytimes.com/2014/01/30/science/earth/climate-change-taking-toll-on-penguins-study-finds.html>. Accessed 17 March 2014.

- New media, unregulated. Examples: blogs, websites, and other written works. Allen L (01 Sept 2010) Announcing PLOS Blogs. Available:<http://blogs.plos.org/plos/2010/09/announcing-plos-blogs/>. Accessed 17 March 2014.
- Master of Science and Doctor of Philosophy theses. Wells A (1999) Exploring the development of the independent, electronic, scholarly journal. M.Sc. Thesis, The University of Sheffield. Available: <http://cumincad.scix.net/cgi-bin/works/Show?2e09>. Accessed 17 March 2014.
- Databases and repositories. Examples: figshare, archive.com. Roberts SB (2013) QPX Genome Browser Feature Tracks. Database: figshare.http://figshare.com/articles/QPX_Genome_Browser_Feature_Tracks/701214. Accessed 17 March 2014.
- Multimedia. Examples: videos, movies, and TV shows. Hitchcock A, producer and director (1954) Rear Window [Film]. Los Angeles: MGM.

Tables

Tables should be included at the end of the manuscript. All tables should have a concise title. Footnotes can be used to explain abbreviations. Citations should be indicated using the same style as outlined above. Tables occupying more than one printed page should be avoided, if possible. Larger tables can be published as Supporting Information. Please ensure that table formatting conforms to our Guidelines for table preparation.

Figure Legends

Figures should not be included in the manuscript file, but figure legends should be. Guidelines for preparing figures can be found [here](#).

Figure legends should describe the key messages of a figure. Legends should have a short title of 15 words or less. The full legend should have a description of the figure and allow readers to understand the figure without referring to the text. The legend itself should be succinct, avoid lengthy descriptions of methods, and define all non-standard symbols and abbreviations.

Further information about figure legends can be found in the Figure Guidelines.

Accession Numbers

All appropriate datasets, images, and information should be deposited in public resources. Please provide the relevant accession numbers (and version numbers, if appropriate). Accession numbers should be provided in parentheses after the entity on first use. Suggested databases include, but are not limited to:

- ArrayExpress
- BioModels Database
- Database of Interacting Proteins
- DNA Data Bank of Japan [DDBJ]
- DRYAD
- EMBL Nucleotide Sequence Database
- GenBank
- Gene Expression Omnibus [GEO]
- Protein Data Bank
- UniProtKB/Swiss-Prot
- ClinicalTrials.gov

In addition, as much as possible, please provide accession numbers or identifiers for all entities such as genes, proteins, mutants, diseases, etc., for which there is an entry in a public database, for example:

- Ensembl
- Entrez Gene
- FlyBase
- InterPro
- Mouse Genome Database (MGD)
- Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)

- PubChem

Providing accession numbers allows linking to and from established databases and integrates your article with a broader collection of scientific information.

Striking Images

Authors are encouraged to upload a "striking image" that may be used to represent their paper online in places like the journal homepage or in search results. The striking image must be derived from a figure or supporting information file from the paper, ie. a cropped portion of an image or the entire image. Striking images should ideally be high resolution, eye-catching, single panel images, and should ideally avoid containing added details such as text, scale bars, and arrows. If no striking image is uploaded, a figure from the paper will be designated as the striking image.

Please keep in mind that PLOS's Creative Commons Attribution License applies to striking images. As such, do not submit any figures or photos that have been previously copyrighted unless you have express written permission from the copyright holder to publish under the CCAL license. Note that all published materials in PLOS ONE are freely available online, and any third party is permitted to read, download, copy, distribute, and use these materials in any way, even commercially, with proper attribution.

Care should be taken with the following image types in particular:

1. PLOS ONE is unable to publish any images generated by Google software (Google Maps, Street View, and Earth)
2. Maps in general are usually copyrighted, especially satellite maps
3. Photographs
4. Commercial or government images, slogans, or logos
5. Images from Facebook or Twitter

Authors must also take special care when submitting manuscripts that contain potentially identifying images of people. Identifying information should not be included in the manuscript unless the information is crucial and the individual has provided written consent by completing the Consent Form for Publication in a PLOS Journal (PDF).

For license inquiries, e-mail [license \[at\] plos.org](mailto:license@plos.org).