

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE INIBITÓRIA DE *Caryocar brasiliense* E *Stryphnodendron adstringens* SOBRE *Candida albicans*.**

*INHIBITORY OF CAPACITY EVALUATION OF *Caryocar brasiliense* AND *Stryphnodendron adstringens* ABOUT *Candida albicans*.*

**Elida Maria da Silva (Silva, E.M.)**

Faculdade de Farmácia, Faculdade Evangélica de Ceres, Ceres-GO, Brasil.  
elidamaria.89@gmail.com

**Ludmila Mariana Rodrigues (Rodrigues, L.M.)**

Faculdade de Farmácia, Faculdade Evangélica de Ceres, Ceres-GO, Brasil.  
ludmilamariana28@gmail.com

**Carlos de Melo Silva Neto (Carlos; SILVA-NETO)**

Responsável técnico no Instituto Federal Goiano, Cidade de Goiás-GO, Brasil.  
carloskoa@gmail.com

**Gilmar Aires da Silva (Silva, G.A.)**

Docente do curso de Farmácia na Faculdade evangélica de Ceres, Ceres Go.  
gilmaraires@hotmail.com

**Renata Silva do Prado (Prado, R.S)**

Docente do curso de Farmácia, Faculdade Evangélica de Ceres, Ceres Go.  
renata.ufg@hotmail.com

**Endereço para correspondência:**

Av. Brasil, S/N, Qd. 13, Setor Morada Verde Ceres – Go. CEP: 763000-000

Fone: (62) 3323-1040

Email: renata.ufg@hotmail.com

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** *Candida albicans* é um fungo oportunista com capacidade de transitar entre as formas leveduriforme e filamentosa, agente etiológico da candidíase. *Caryocar brasiliense* é um fruto nativo do cerrado, pertencente ao gênero *Caryocar* e a família *Caryocaraceae*, conhecido popularmente como pequi, têm sido utilizadas na medicina popular contra gripes, resfriados, doenças inflamatórias, antioxidante e antifúngico. *Stryphnodendron adstringens* é uma planta popularmente conhecida como barbatimão, e também tem sido utilizada no tratamento de várias infecções, onde preparações das folhas e cascas podem ser usadas, por via tópica ou via oral. Este estudo teve por objetivo avaliar a atividade antifúngica do extrato hidroalcoólico da casca de *C. brasiliense* e da raiz do *S. adstringens*, sobre o fungo *C. albicans*. **METODOLOGIA:** A avaliação da atividade de extratos foi realizada a partir da análise da capacidade inibitória utilizando-se ensaios de concentração inibitória mínima (CIM) dos diferentes extratos sobre o fungo, bem como teste de sensibilidade em placa e teste de sensibilidade utilizando disco de difusão e avaliação da interação dos extratos com antifúngicos usados no tratamento da candidíase, para determinação de possível efeito sinérgico ou antagônico. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** De acordo com os resultados obtidos o extrato de *C. brasiliense* não inibiu o crescimento de *C. albicans* em nenhuma das concentrações testadas, bem como o extrato de *S. adstringens* não apresentou inibição de crescimento nas células leveduriformes nas concentrações avaliadas. **CONCLUSÃO:** Os extratos de *C. brasiliense* e *S. adstringens* não apresentam atividade inibitória contra o fungo *C. albicans*.

**Palavras-Chave:** *C. albicans*. *S. adstringens*. *C. brasiliense*. Plantas medicinais. Candidíase.

## Abstract

**INTRODUCTION:** *Candida albicans* is an opportunistic fungus with the capacity of transiting between yeast and filamentous forms, the etiological agent of candidíasis. *Caryocar brasiliense* is a native fruit of cerrado, belonging to the genus *Caryocar* and the *Caryocaraceae* family, popularly known as pequi. It has been used in popular medicine against colds, inflammatory diseases, antioxidant and antifungal. *Stryphnodendron adstringens* is a plant popularly known as barbatimão, and has also been used in the treatment of various infections, where leaves and wood skin preparations can be used either topical or orally. The objective of this study was to evaluate the antifungal activity of the hydroalcoholic extract of the *C. brasiliense* wood skin and the root of the *S. adstringens* on the fungus *C. albicans*. **METHODOLOGY:** The evaluation of the extracts activity was carried out from the analysis of the (MIC) of the different extracts on the fungus, as well as plate sensitivity test and sensitivity test using diffusion disc and evaluation of the interaction of extracts with antifungals used in the treatment of candidíasis, for determination of possible synergistic or antagonistic effects. **RESULT AND DISCUSSION:** According to the results, *C. brasiliense* extract did not inhibit the growth of *C. albicans* in any of the concentrations tested as well as the extract of *S. adstringens* did not present inhibition of growth in yeast cells at the concentrations evaluated. **CONCLUSION:** The extracts of *C. brasiliense* and *S. adstringens* do not present inhibitory activity against the fungus *C. albicans*.

**Keywords:** *C. albicans*. *S. adstringens*. *C. brasiliense*. Medicinal plants. Candidíasis.

## 1 INTRODUÇÃO

2  
3 *Candida albicans* é um fungo oportunista pertencente ao gênero *Candida*, que contém  
4 cerca de 200 espécies diferentes, sendo encontrado na microbiota normal humana, porém  
5 pode levar a infecções, conhecidas como candidíases. É um fungo pertencente ao gênero  
6 *Candida*, da família *Cryptococcaceae*, da ordem *Cryptococcales*, da classe *Blastomycetes*, filo  
7 *Ascomycota* e reino *Fungi* (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007; GIOLO;  
8 SVIDZINSKI, 2010; TAIRA, 2011, SANTANA et al., 2013).

9 Trata-se de um fungo dimórfico que tem a capacidade de transitar entre as formas  
10 leveduriforme e filamentosa, em estado saprofítico, em associação a colonização  
11 assintomática esse fungo apresenta a forma leveduriforme, já a forma filamentosa (pseudo-  
12 hifas e hifas verdadeiras), são observadas em processos patogênicos (ÁLVARES;  
13 SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007). A habilidade desse fungo em transitar entre as formas  
14 leveduriforme e filamentosa é denominado de dimorfismo. Há uma variedade de estímulos  
15 ambientais que podem alterar a morfologia desse fungo:  $\text{pH} \leq 6$  favorece o crescimento na  
16 forma de levedura, enquanto  $\text{pH} \geq 7$  favorece o crescimento de hifas, bem como a temperatura,  
17 e a concentração de  $\text{CO}_2$  (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; MAYER; WILSON; HUBE,  
18 2013).

19 Embora a principal espécie de *Candida* relacionada a Candidíase seja a *C. albicans*,  
20 outras espécies não albicans, como a *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii* e *Candida*  
21 *glabrata* são importantes patógenos associados a essas infecções oportunistas (COSTA, 2009;  
22 PEIXOTO et al., 2014; MENEZES et al., 2004).

23 As infecções provocadas por fungos leveduriformes do gênero *Candida*, são  
24 conhecidas como candidíases ou candidoses sendo o principal agente causador dessas  
25 infecções o fungo *C. albicans*. Essas lesões podem variar de leve, moderada, aguda ou lesões  
26 superficiais ou profundas (BARBEDO; SGARBI, 2010).

27 As infecções causadas pela *C. albicans* se manifestam clinicamente como  
28 mucocutânea, cutânea e sistêmica. A candidíase mucocutânea afeta principalmente a mucosa  
29 da boca e da vagina, já a candidíase cutânea afeta os tecidos das áreas intertriginosas da pele  
30 como virilhas, axilas e dobras da pele, interdigitais das mãos, dos pés e unhas. Candidíase  
31 sistêmica pode chegar a diversos órgãos como pulmões, coração, rins, entre outros. Outra  
32 forma observada de candidíase é a candidíase alérgica que pode se apresentar nas formas de

1 lesões cutâneas ou lesões eczematoides (COUTO; CARLOS; MACHADO, 2011; MENEZES  
2 et al., 2004; PEIXOTO et al., 2014).

3 No caso da candidíase vaginal e da maioria das demais candidoses, estão os fatores  
4 que modificam as características da microbiota normal do indivíduo, podendo gerar uma  
5 diminuição no sistema imunológico. Pode-se citar a gravidez, o diabetes, o uso de  
6 corticosteróides, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA/AIDS), transplante de  
7 órgãos ou o uso de antibióticos (CARVALHO et al., 2003).

8 Outros fatores como: hábitos de higiene inadequado, contraceptivos orais, e aumento  
9 da temperatura causado pelo uso de roupas que dificultem a ventilação, podem apresentar  
10 risco para o desenvolvimento de candidose. Relações sexuais podem ser consideradas também  
11 um fator de risco, pois podem transportar a cepa para locais que não contenham esse fungo  
12 naturalmente (candidíase exógena) (PEREIRA, 2012).

13 A determinação de um diagnóstico correto, para doenças causadas por fungos como *C.*  
14 *albicans* é de extrema importância, pois levando em conta sua expressão genética, corre-se o  
15 risco de aumento do número de cepas resistentes aos medicamentos tradicionalmente  
16 utilizados (BARBEDO; SGARBI, 2010).

17 Para o tratamento de infecções fúngicas são utilizados os agentes antifúngicos como os  
18 imidazóis, triazóis (azóis), poliênicos e equinocandinas. Esses medicamentos podem ser  
19 administrados tanto na forma sistêmica ou tópica. Dentre essas classes antifúngicas citadas, os  
20 azólicos são os mais utilizados, devido a sua baixa toxicidade em relação a anfotericina B e do  
21 baixo custo quando comparado a equinocandinas (MENEZES et al., 2013).

22 Silva (2011), demonstrou em seu estudo a importância dos testes de suscetibilidade *in*  
23 *vitro* em casos de candidíases para escolher um tratamento adequado, já que foi observada  
24 uma grande resistência de isolados de *Candida* a fármacos antifúngicos, especialmente os  
25 azólicos, como fluconazol, anfotericina B, e outros. Diante desse cenário, a busca por novas  
26 terapias adquire importância.

27 Dalazen e colaboradores (2011) sugere que cada região selecione novos antifúngicos  
28 mais eficazes para o tratamento de candidíase, tendo em vista o perfil dos pacientes e a  
29 resistência fúngica observada em determinada população.

30 O uso de plantas medicinais tem sido incentivado, tomando-se cuidado com a falácia  
31 de que “se é natural não faz mal”, uma vez que existem doses que podem ser tóxicas, por isso  
32 é importante a realização de novos estudos e testes *in vitro* com plantas, gerando uma

1 possibilidade de novos fármacos, e uma padronização de doses seguras (SIMÕES et al., 2007;  
2 CORRÊA; MELO; COSTA, 2008).

3 *Caryocar brasiliense* é uma planta nativa do cerrado, pertencente ao gênero *Caryocar*  
4 e à família *Caryocaraceae*. A principal espécie de ocorrência na região é *C. brasiliense*  
5 *Camb*, conhecido como pequi, piqui e piquiá. Possui diversos estudos quanto à sua atividade  
6 farmacológica e seus componentes químicos, como os componentes fenólicos, alcaloides,  
7 heterosídeos e esteróides (VERA et al., 2007; CARVALHO; PEREIRA; ARAÚJO, 2015).

8 As folhas do pequi são utilizadas na medicina popular contra gripes, resfriados,  
9 doenças inflamatórias, lesões gástricas, regulador de ciclo menstrual. Já o óleo tem sido  
10 utilizado no tratamento de bronquites, como tonificante, antioxidante e antifúngico  
11 (ROESLER et al., 2007).

12 A fruta do *C. brasiliense* possui altas concentrações de antioxidantes como, vitamina  
13 E, carotenóides e compostos fenólicos. Sabe-se que essas substâncias têm importante ação em  
14 algumas doenças, decorrente dos danos oxidativos. Nas folhas de *C. brasiliense* são  
15 encontradas grandes quantidades de compostos fenólicos, como flavonoides, que são  
16 conhecidos por propriedades farmacológicas como, anti-inflamatória, antiviral, antialérgica e  
17 antioxidante (MIRANDA-VILELA; RESCK; GRISOLIA, 2008; CARVALHO; PEREIRA;  
18 ARAÚJO, 2015).

19 *S. adstringens* é uma planta popularmente conhecida como barbatimão, barbatimão-  
20 verdadeiro, barba-de-timão, barbatimão-vermelho, casca-da-mocidade, casca-da-virgindade,  
21 iba-timão, ubatimô, chorãozinho-roxo e paricana. Trata-se de uma espécie arbórea pertencente  
22 à família *Leguminosae*, de pequeno porte, com caule e ramos de formato tortuoso, casca  
23 grossa, rugosa e rígida, e parte interna com cerne de coloração avermelhada. É uma espécie  
24 tipicamente do cerrado podendo ser encontradas em outros estados como Bahia, Minas  
25 Gerais, São Paulo e Mato Grosso (GOULART, 2010; LIMA et al., 2016; SOUZA et al., 2007;  
26 GLASENAAP, 2011; FERREIRA; SILVA; SOUZA, 2013).

27 O *S. adstringens* é uma planta com uso medicinal, muito utilizada pelo conhecimento  
28 empírico, onde preparações das folhas e cascas podem ser usadas, por via tópica ou via oral,  
29 em forma de infusão, decocção, banhos, emplastos, garrafadas, pós e extratos alcoólicos  
30 (MELO, 2011).

31 As Folhas e cascas desta planta são tônicas e podem ser usadas contra tosses,  
32 queimaduras, feridas malignas, oftalmias crônicas e escorbuto. Pode ser indicado para várias  
33 outras doenças, como, corrimento vaginal, hemorragias uterinas e intestinais, úlceras da pele,

1 úlceras do estômago, diarreia, leucorréia e hérnia, sendo que nestes casos a preparação mais  
2 usada é o chá das cascas. O extrato alcoólico dessas cascas também é usado como  
3 adstringente, com efeito cicatrizante, antidiarreico, antisséptico, anti-hemorragico, anti-  
4 inflamatório e uretrites, contra tumores e gastrite (SOUZA et al., 2007; FERREIRA; SILVA;  
5 SOUZA, 2013).

6 A atividade farmacológica do barbatimão é atribuída à quantidade de taninos presentes  
7 em sua casca. São encontrados cerca de 20% de taninos totais, dos quais já foram isolados da  
8 casca taninos condensados como flavan-3-óis, prodelfinidinas e prorobinetinidinas e, podendo  
9 ainda ser encontrados outros constituintes químicos, como alcaloides, flavonoides, terpenos,  
10 estilbenos, esteroides, inibidores de proteases (VASCONCELOS et al., 2004; SIMÕES et al.,  
11 2007; LIMA et al., 2016).

12 Todos estes estudos demonstram a atividade antimicrobiana de diferentes extratos de  
13 partes distintas de *S. adstringens*, evidenciando seu potencial como candidato à fármaco e  
14 gerador de protótipos antimicrobianos.

15 A espécie *C. albicans* foi escolhida dentre outros isolados, para ser analisada, devido a  
16 sua alta incidência nas candidíases, enquanto o potencial antimicrobiano das espécies nativas  
17 do cerrado *C. brasiliense* e *S. adstringens* foi determinante no delineamento deste estudo.  
18 Diante disto e da crescente necessidade da busca por novas terapias, este estudo teve como  
19 meta identificar a atividade antifúngica, destas plantas, sobre o fungo *C. albicans*.

20

## 21 **METODOLOGIA**

22

23 Foi realizado um estudo de caráter qualiquantitativo, de abordagem indutiva, com  
24 procedimento comparativo estatístico e técnica de documentação direta em laboratório.

25

### 26 **Coleta do material vegetal**

27 A coleta de frutos de pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess), foi realizada na cidade de  
28 Goiânia– GO, situada na região do Vale do Meia Ponte. As amostras foram identificadas por  
29 especialista botânico, coletou-se material de três indivíduos diferentes. A casca do fruto foi  
30 separada da semente, sendo que o processo de secagem das amostras foi realizado em estufa  
31 de ventilação forçada a 60°C por 48 horas no laboratório de coleções biológicas do IFG -  
32 Cidade de Goiás. As coletas de material botânico foram autorizadas pelo IBAMA com a  
33 licença ambiental do SISBIO (Número: 24365-1).

1 A coleta das raízes de barbatimão {*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville}, foi  
2 realizada na cidade de Goiás– GO, situada na região do Vale do Rio Vermelho. As amostras  
3 foram identificadas por especialista botânico, foi coletado material de três  
4 indivíduos diferentes. O processo de secagem das amostras foi realizado em estufa de  
5 ventilação forçada a 60°C por 48 horas no laboratório de coleções biológicas do IFG - Cidade  
6 de Goiás. As coletas de material botânico foram autorizadas pelo IBAMA com a licença  
7 ambiental do SISBIO (Número: 24365-1).

8

### 9 **Obtenção dos extratos de *C. brasiliense* e *S. adstringens***

10 A obtenção dos extratos foi realizada de acordo com Pacheco e colaboradores (2015),  
11 por se tratarem de diferentes espécies de plantas, mas igualmente quanto à marcha  
12 analítica. A casca do *C. brasiliense* (seca) e as raízes (secas) de *S. adstringens* foram  
13 pulverizadas, após esse processo, foram armazenadas em frasco escuro contendo etanol  
14 (proporção 1:4) mantido sob refrigeração. Posteriormente, esta amostra foi filtrada e seca com  
15 auxílio de uma estufa. O extrato resultante foi armazenado em placas de petri, envolvidas em  
16 papel filme, até o momento de ressuspensão (COSTA, 2013).

17

### 18 **Cultivo e manutenção do fungo**

19 Para a realização do cultivo, a cepa de *C. albicans* ATCC (American Type Culture  
20 Collection - 22019) foi cultivada em meio Ágar Sabouraud Dextrose (Peptona 10 g/L;  
21 Dextrose 40 g/L; Ágar 15 g/L). A cepa de *C. albicans* ATCC foi mantida à temperatura  
22 ambiente por sete dias, quando foi submetida à experimentação ou novo repique (MENEZES  
23 et al., 2012).

24

### 25 **Teste de diluição em caldo**

26 Os ensaios de inibição foram realizados pelo método de macrodiluição de acordo com  
27 a diretriz NCCLS M27-A2 (2002). Células de *C. albicans* foram mantidas em meio ágar  
28 nutriente suplementado com glicose por sete dias, a temperatura ambiente, e inoculadas em  
29 meio nutriente líquido acrescido dos diferentes extratos de *C. brasilienses* e *S. adstringens*.  
30 Diluições seriadas das soluções em estoque dos extratos foram preparadas em meio nutriente  
31 como diluente para que fossem obtidas concentrações finais diferentes dos compostos em  
32 estudo. O crescimento do fungo foi determinado de acordo com Prado e colaboradores (2014)  
33 com modificações, por se tratarem de espécies diferentes, com exceção do tempo de

1 incubação do ensaio (3 dias). Foi realizada análise espectrofotométrica a 520 nm após 3 dias  
2 de crescimento, quando foi possível determinar a CIM.

3

#### 4 **Teste de sensibilidade em placas**

5 Para o teste de sensibilidade em meio sólido, amostras contendo  $10^4$  de células de *C.*  
6 *albicans*, com sete dias de crescimento ágar Sabouraud sólido, foram transferidas para placas  
7 com meio ágar nutriente suplementado com glicose somado aos extratos de *C. brasilienses* e  
8 *S. adstringens* em diferentes concentrações. As placas foram incubadas por sete dias a  
9 temperatura ambiente antes de serem fotografadas, de acordo com Betoni e colaboradores  
10 (2006) com modificações, por se tratarem de espécies diferentes de microrganismos,  
11 seguindo-se os preceitos metodológicos, com exceção do tempo de cultivo antes da fotografia  
12 (sete dias ao invés de 24 horas).

13

#### 14 **Teste de sinergismo**

15 Para o teste de sinergismo, foram preparadas placas-controle contendo os extratos de  
16 casca de *C. brasilienses* e raiz de *S. adstringens*, além de placas-controle com drogas  
17 conhecidas (fluconazol IC<sub>50</sub>= 16 µg/mL e sulfonamida IC<sub>50</sub>=20 µg/mL). As placas de teste,  
18 para avaliação da atividade sinérgica entre extratos etanólicos de casca de *C. brasiliense* e raiz  
19 de *S. adstringens* em combinação com fluconazol e sulfonamida, foram construídas em  
20 triplicatas biológicas, sendo utilizadas as mesmas concentrações dos extratos de casca de *C.*  
21 *brasiliense* e raiz de *S. adstringens*, bem como da fluconazol e sulfonamida das placas-  
22 controle.

23 Os testes foram assim distribuídos: interação entre sulfonamida e casca de *C.*  
24 *brasiliense* e raiz de *S. adstringens*, interação entre casca de *C. brasiliense* e raiz de *S.*  
25 *adstringens* e fluconazol. As placas foram incubadas por sete dias a temperatura ambiente  
26 antes de serem fotografadas, segundo Betoni e colaboradores (2006) com modificações, por  
27 se tratarem de espécies diferentes de microrganismos, seguindo a mesma marcha analítica,  
28 com exceção do tempo de cultivo antes da fotografia (7dias ao invés de 24 horas).

29

#### 30 **Teste de sensibilidade por disco de difusão**

31 Discos de papel esterilizados (diâmetro de 6 mm) foram embebidos previamente nos  
32 extratos obtidos da planta em diferentes concentrações. Posteriormente, foram inoculados  
33  $1,5 \times 10^8$  células/mL de *C. albicans* em placas de meio nutriente e, em seguida, os discos foram

1 retirados dos tubos com uma pinça esterilizada e colocados sobre as placas contendo o meio.  
 2 As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 7 dias, após esse período foram  
 3 mensurados os halos de inibição do crescimento, em milímetros, com o auxílio de um  
 4 paquímetro (BAUER et al., 1966; NCCLS, 2002).

## 6 **Análise estatística**

7 Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados apresentados com  
 8 análises de média e desvio padrão. Foi aplicado teste de ANOVA para a comparação dos  
 9 valores obtidos no teste de diluição em caldo. Para as comparações estatísticas, foi utilizado o  
 10 software Estatística versão 8.0. Os valores foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

11 Todos os experimentos forão realizados em triplicatas simples e biológicas.

## 13 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

15 As amostras secas de *C. brasiliense* e *S. adstringens* foram pulverizadas, e submetidas  
 16 ao etanol (tabela 1) e ao metanol (tabela 2) como solvente para extração, após os processos de  
 17 filtragem as amostras foram secas com o auxílio de uma estufa, calculando-se o rendimento  
 18 total dos extratos.

20 **Tabela 1:** Massa total e rendimentos dos extratos etanólicos de *C. brasiliense* e *S. adstringens*

Espécie	Extratos	Massa (g)	EE (g)	Rendimento (%)
<i>C. brasiliense</i>	Casca	5,378	2,1443	39,87
<i>S. adstringens</i>	Raiz	19,825	1,2486	6,29

\*EE= Extrato Etanólico

21 **Tabela 2:** Massa total e rendimentos dos extratos metanólicos de *C. brasiliense* e *S.*  
 22 *adstringens*

Espécie	Extratos	Massa (g)	EM (g)	Rendimento (%)
<i>C. brasiliense</i>	Casca	16,1870	2,6266	16,23
<i>S. adstringens</i>	Raiz	36,2708	3,5678	9,84

\*EM= Extrato Metanólico

1           Desse modo, utilizando o etanol como solvente, para 5,378 g de casca de *C.*  
2 *brasiliense*, e 19,825 g de raiz de *S. adstringens*, os percentuais de rendimento dos extratos  
3 foram de 39,87% e 6,29% respectivamente. E utilizando o metanol como solvente, para  
4 16,1870 g de casca de *C. brasiliense*, e 36,2708 g de raiz de *S. adstringens*, os percentuais de  
5 rendimento dos extratos foram de 16,23% e 9,84% respectivamente.

6           Marques e colaboradores (2002) utilizando mesocarpo externo do *C. brasiliense*, e  
7 etanol como solvente, para 3,01 g obteve 0,68% de rendimento. E com metanol, para 15,12 g  
8 obteve 3,40% de rendimento, após 8 dias de extração. Breda e colaboradores (2016),  
9 obtiveram um rendimento de 26,29%, no extrato da casca pequi, utilizando 10 g de pó da  
10 planta, e etanol como solvente. Na análise aqui realizada, a extração se deu por 24, 48 e 72  
11 horas, perfazendo valores de rendimento ainda mais altos que os obtidos nos dois estudos  
12 citados.

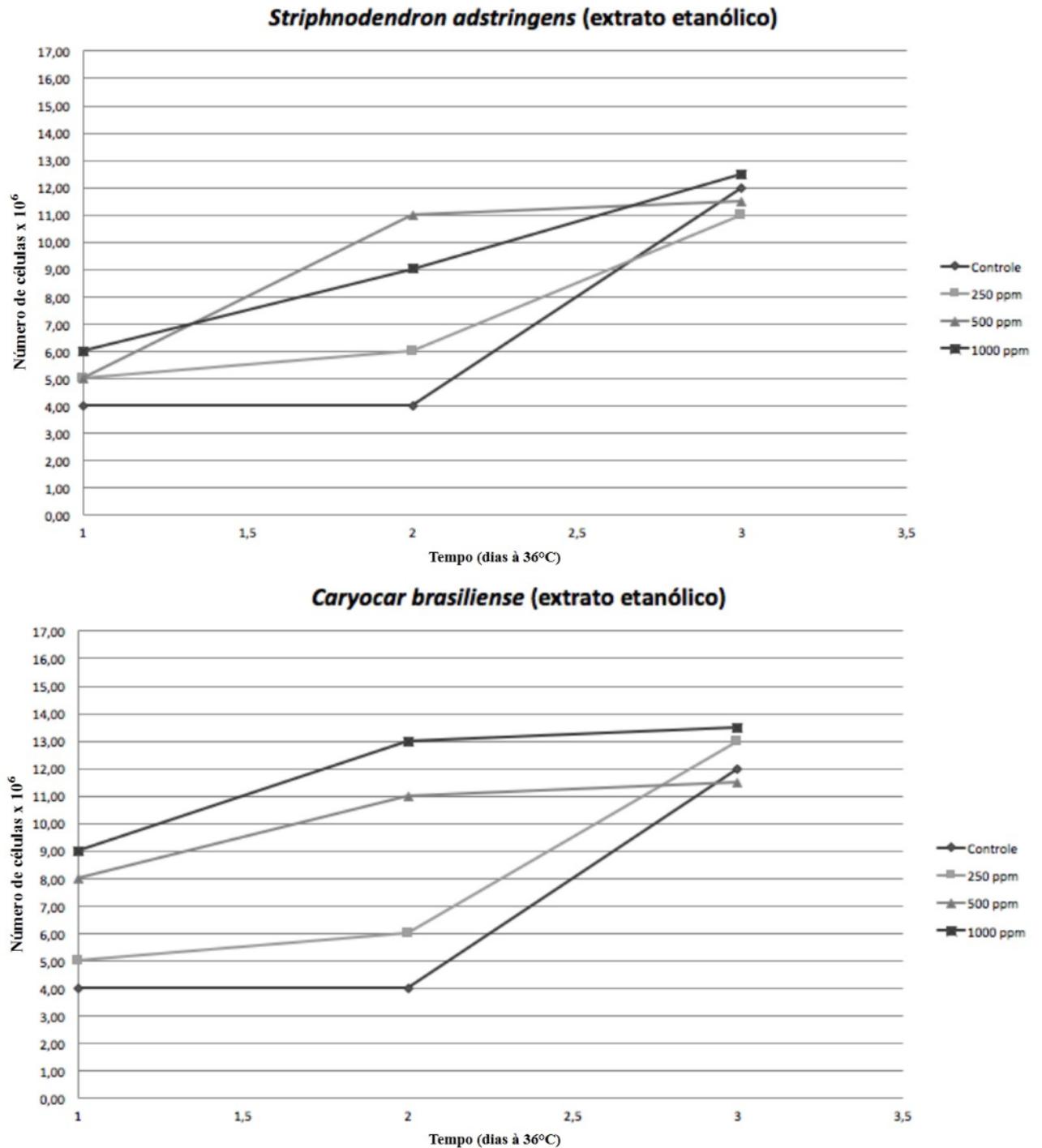
13           Henriques e colaboradores (2016), utilizaram etanol como solvente para obtenção do  
14 extrato de *S. adstringens*, conseguindo rendimento de 44,8%. Acredita-se que o alto valor de  
15 rendimento obtido esteja associado ao uso do ultrassom como parte do processo.

16           Tanto etanol como metanol são solventes apolares, no entanto, na literatura tem sido  
17 descritos valores de rendimento melhores a partir do uso do metanol (MARQUES, 2002)  
18 corroborando com os resultados aqui apresentados para o *S. adstringens*, no entanto para o *C.*  
19 *brasiliense*, foi obtido melhor rendimento com o etanol.

20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

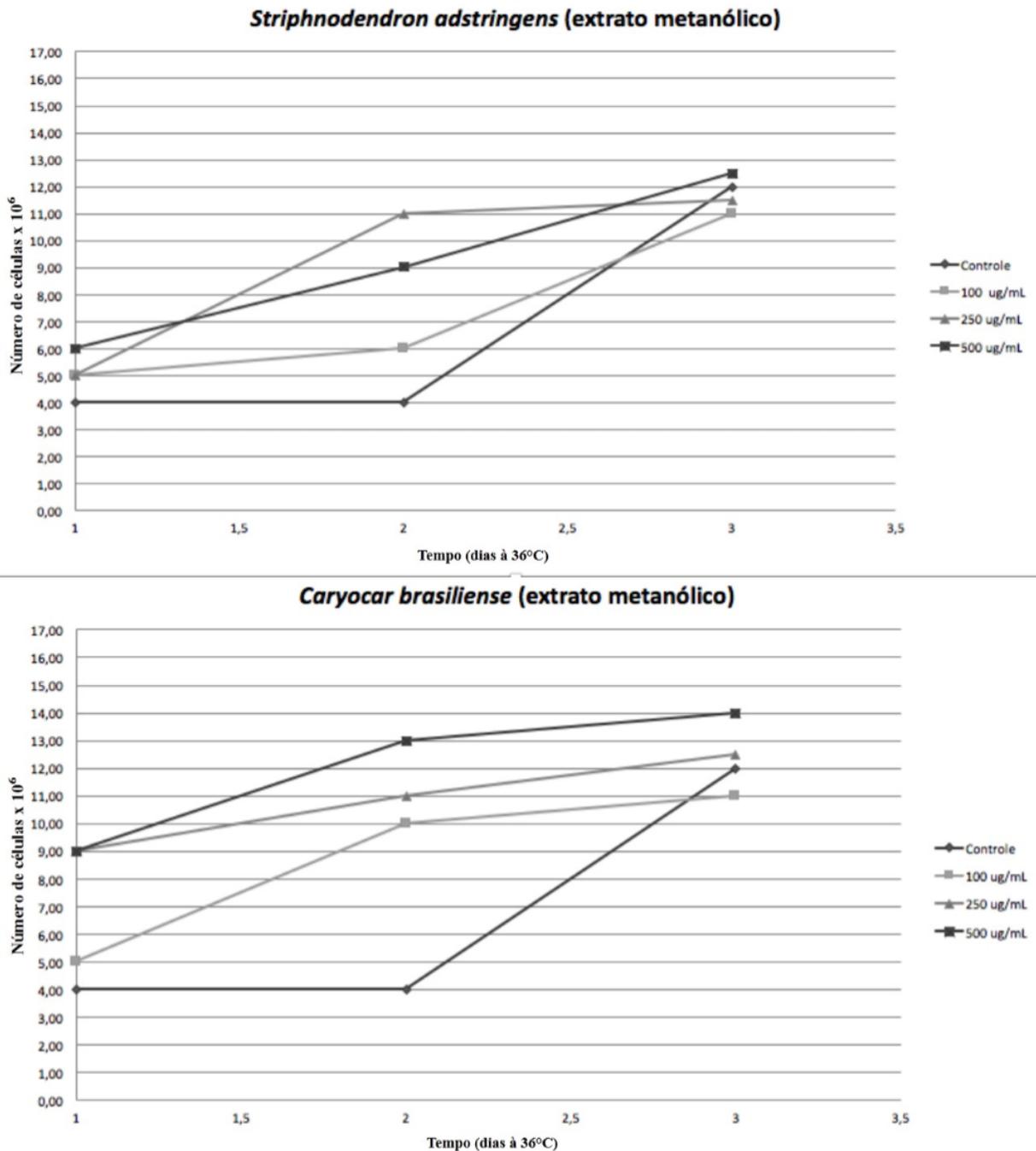
### 1 Teste de diluição em caldo

2 Os ensaios de inibição foram realizados pelo método de macrodiluição de acordo com  
3 a diretriz NCCLS M27-A2 (2002). Observando os resultados nas figuras 1 e 2.



4

5 *Figura 1.* Teste de diluição em caldo dos extratos etanólicos de *S. adstringens* e *C. brasiliense*  
6 nas concentrações, 250, 500 e 1000 ppm sobre o crescimento de *C. albicans*.



1

2 *Figura 2.* Teste de diluição em caldo dos extratos metanólicos de *S. adstringens* e *C.*  
 3 *brasiliense* nas concentrações, 100, 250 e 500 µg/mL sobre o crescimento de *C. albicans*.

4

5 Analisando as figuras acima, percebe-se que não houve inibição do crescimento do  
 6 fungo em nenhuma das concentração testadas, tanto com solvente etanólico, quanto com o  
 7 solvente metanólico, inviabilizando o cálculo do CIM. Em contrapartida Luiz e colaboradores  
 8 (2015), demonstraram através do ensaio de micro diluição a ação antifúngica do extrato da  
 9 casca do caule de *S. adstringens* frente ao fungo *C. albicans*. Neste estudo, os autores

1 identificaram, valores de CIM entre 0,97 e 7,80 µg/mL contra o fungo estudado, mostrando  
2 assim potencial terapêutico contra candidíase. Cabe ressaltar que os valores encontrados por  
3 Luiz e colaboradores (2015), são referentes a casca do caule enquanto neste estudo os ensaios  
4 foram realizados com a raiz, podendo a diferença entre os resultados, ser atribuída a este fato.

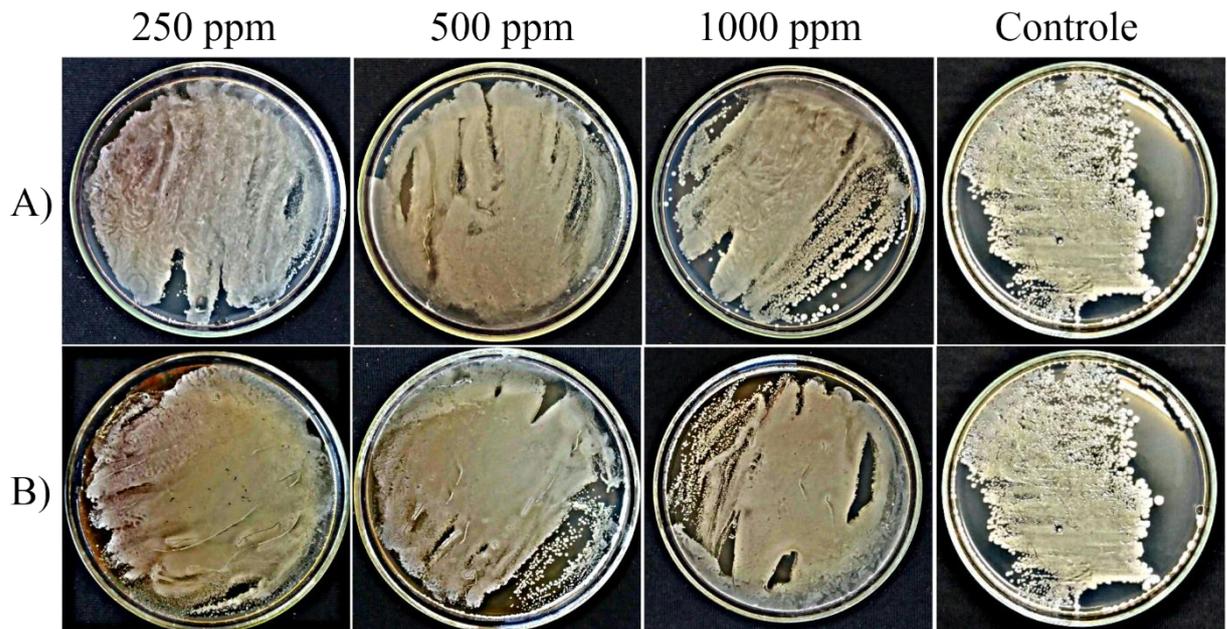
5 O estudo realizado por Breda e colaboradores (2016), avaliou por meio do ensaio de  
6 micro diluição a ação antifúngica do extrato da casca e da folha de *C. brasiliense* contra os  
7 seguintes fungos *Alternaria alternata*, *Alternaria solani* e *Venturia solani*; os extratos obtidos  
8 a partir da casca do pequi determinaram valores de CIM de 350 µg/mL, para *A. Solani* e *V.*  
9 *pirina* e 500 µg/mL, para *A. alternata*, enquanto os extratos da folhas de *C. brasiliense*  
10 apresentaram valores de CIM maiores, que foram, 1000 µg/mL para *A. alternata* e *A. solani* e  
11 400 µg/mL para *V. pirina*. Sendo esses extratos considerados efetivos contra essas espécies de  
12 fungos.

13 Em estudo realizado por Amaral (2014), em teste de determinação da concentração  
14 inibitória mínima, utilizando o pequi, foram encontrados valores de 11,25, 22,50 e 11,25  
15 mg/mL contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*  
16 respectivamente. A obtenção dos extratos foi realizada via CO<sub>2</sub> supercrítico. Este somado ao  
17 fato das bactérias possuírem menos estruturas de resistência, pode justificar os valores de  
18 concentração inibitória mínima fato do estudo feito por Amaral (2014), possuir valores de  
19 CIM e este estudo não possuir.

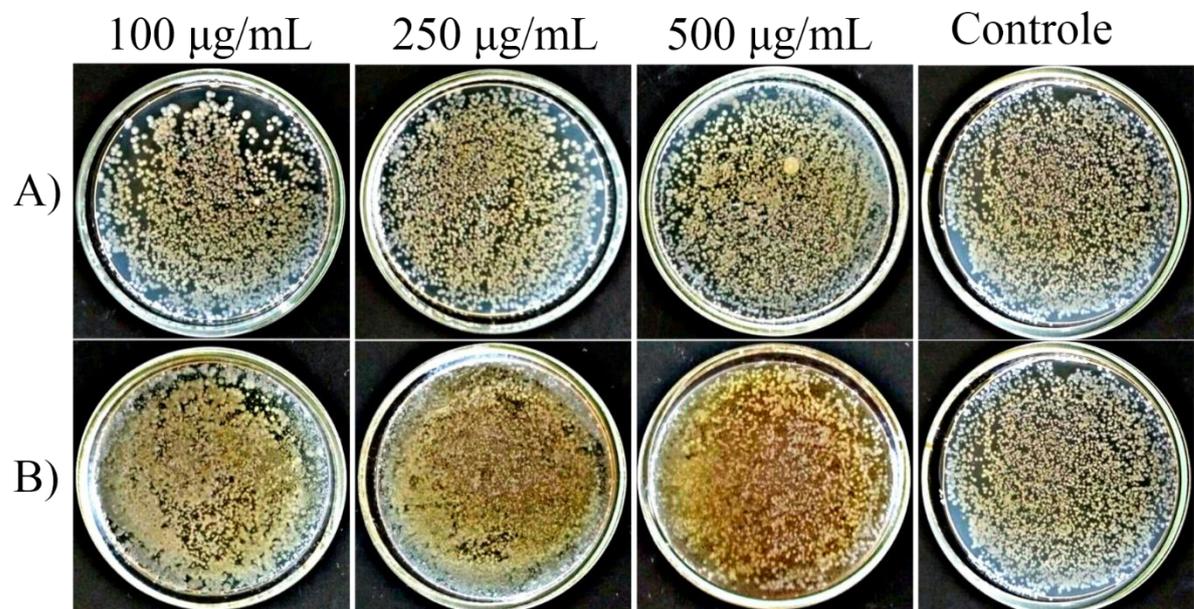
20

### 21 **Teste de sensibilidade em placas.**

22 Para o teste de sensibilidade em placas foram inoculadas 10<sup>4</sup> de células fúngicas em  
23 meio ágar nutriente, suplementado com extratos etanólicos e metanólicos obtidos da casca do  
24 *C. brasiliense*, e da raiz de *S. adstringens* nas concentrações de 250 ppm, 500 ppm e 1000  
25 ppm do extrato etanólico (FIGURA 3) e concentrações de 100 µg/mL, 250 µg/mL e 500  
26 µg/mL, do extrato metanólico (FIGURA 4).



1  
2 *Figura 3:* Crescimento de *C. albicans* em meio ágar nutritivo, suplementados com extratos  
3 etanólicos de raiz de *S. adstringens* (A) e casca de *C. brasiliense* (B) nas concentrações de  
4 250 ppm, 500 ppm e 1000 ppm.



6  
7 *Figura 4:* Crescimento de *C. albicans* em meio ágar nutritivo, suplementados com extratos  
8 metanólicos de raiz de *S. adstringens* (A) e casca de *C. brasiliense* (B) nas concentrações de  
9 100 µg/mL, 250 µg/mL e 500 µg/mL.

10  
11 Nas placas contendo *C. brasiliense* quando comparados com as placas controle,  
12 observou-se que tanto o extrato etanólico, quanto o extrato metanólico não apresentou

1 atividade inibitória frente ao fungo *C. albicans*. Pode-se observar que o extrato metanólico da  
2 casca do *C. brasiliense* estimulou o crescimento das colônias, acredita-se que possa ser devido  
3 as altas concentrações de carboidratos, cinzas, magnésio, cálcio, manganês e cobre presentes.  
4 (ROESLER et al., 2007, CARVALHO et al., 2015).

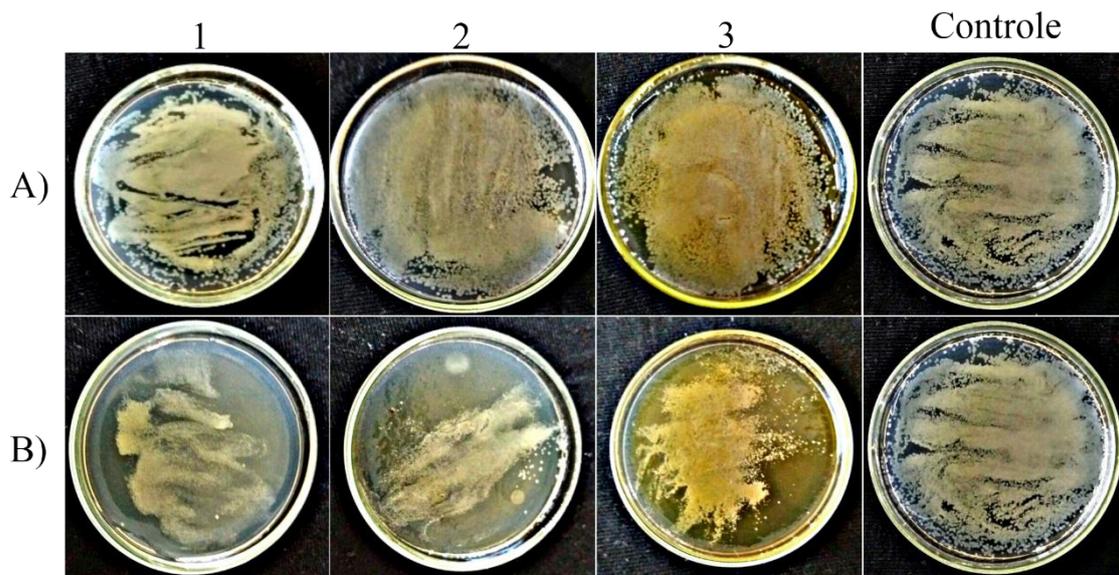
5 Nas placas contendo *S. adstringens* quando comparados com as placas controle,  
6 observou-se que tanto o extrato etanólico, quanto o extrato metanólico não apresentou  
7 atividade inibitória frente ao fungo *C. albicans* observando-se apenas diferença no padrão  
8 morfológico macroscópico das colônias apresentando colônias maiores e aspecto cerebiforme  
9 mais pronunciado nas placas com extrato etanólico, resultado semelhante foi encontrado por  
10 Faria e colaboradores (2017) demonstrando que o extrato etanólico de geopropolis de  
11 *Melipona quadrifasciata*, quanto o mel não inibiram o crescimento de *C. albicans* em  
12 nenhuma das concentrações testadas.

13 No entanto, em um estudo realizado por Paula-Júnior e colaboradores (2004), que  
14 avaliaram a atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das folhas e do  
15 mesocarpo interno do *C. brasiliense*, obtendo resultados favoráveis para inibição do  
16 crescimento microbiano de algumas cepas estudadas como *Staphylococcus aureus*,  
17 *Escherichia coli* e outros, através do método de difusão em ágar, assim como detectou  
18 influência sobre o crescimento de fungos, entre eles *C. albicans*.

19

## 20 **Teste de sinergismo**

21 Teste de atividade sinérgica entre extratos metanólicos da raiz de *S. adstringens* e  
22 casca de *C. brasiliense* em combinação com fluconazol e sulfametoxazol + trimetoprima. Para  
23 o teste de sinergismo, foram construídas placas contendo os extratos de casca de *C.*  
24 *brasiliense* (500 µg/mL) e raiz de *S. adstringens* (500 µg/mL) além de placas-controle com  
25 drogas conhecidas (fluconazol IC<sub>50</sub>= 16 µg/mL e sulfonamida IC<sub>50</sub>=20 µg/mL). Os  
26 resultados podem ser observados na figura 5.



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23

Figura 5: Em A1 controle sulfametoxazol + trimetoprima; Em A2 interação entre raiz de *S. adstringens* com sulfametoxazol + trimetoprima; A3 interação entre casca *C. brasiliense* com sulfametoxazol + trimetoprima; Em B1 controle fluconazol; em B2 interação entre raiz de *S. adstringens* com fluconazol; em B3 interação entre casca de *C. brasiliense* com fluconazol.

O extrato de *C. brasiliense* somado ao fluconazol, quando comparado com a placa controle, apresentou um aumento no crescimento do fungo, caracterizando um efeito antagonista (figura 5/imagem B3). Já Kim e colaboradores (2014), analisando o efeito de *Eisenia bicyclis*, somado ao fluconazol, comprovou efeito sinérgico contra o fungo *C. albicans*.

O sulfametoxazol + trimetoprima utilizado no SUS como primeira escolha para o tratamento de micoses sistêmicas, foi analisado neste estudo somado ao extrato do pequi, e mesmo sozinho não inibiu o crescimento do fungo *C. albicans*, sugerindo resistência. Na presença do extrato da planta, pode-se observar ainda colônias maiores com aspecto mais cremoso quando comparado com as placas controle. Efeito semelhante foi observado por Almeida (2015), que em seu estudo demonstrou efeito antagonístico do extrato da raiz de *Handroanthus serratifolius* com o antifúngico sulfonamida; e atividade sinérgica do extrato da raiz com anfotericina B.

Já o extrato de barbatimão com fluconazol e barbatimão com sulfametoxazol + trimetoprima quando comparado com as placas controle, observou-se que não houve efeito antagonístico, nem efeito sinérgico. O mesmo efeito foi demonstrado por Pacheco e

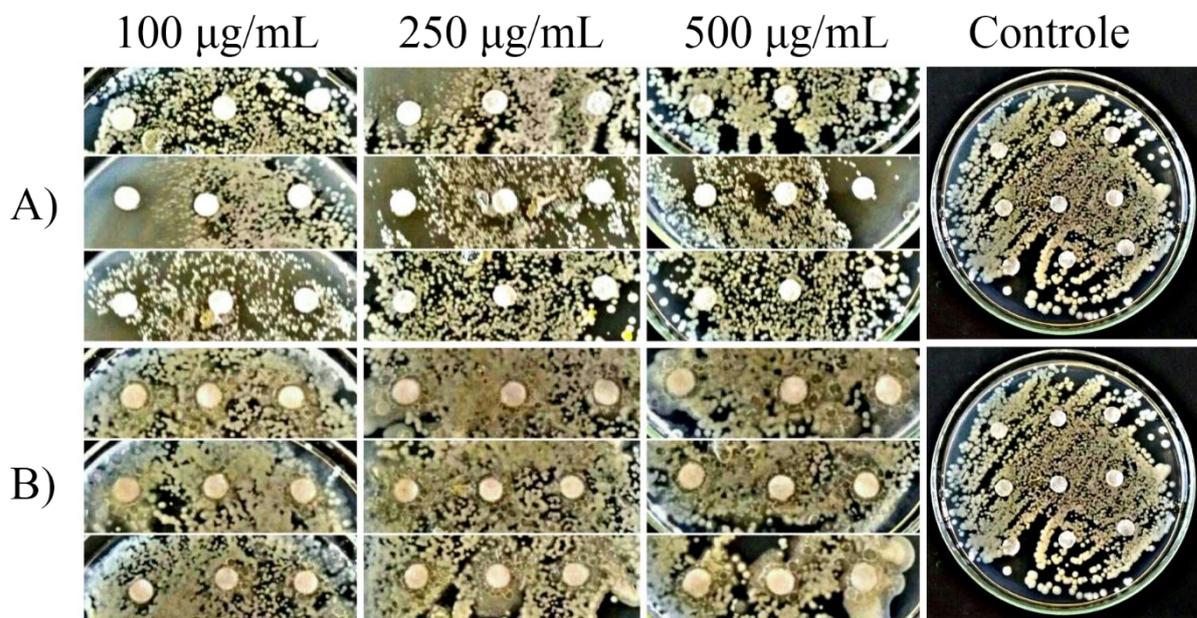
1 colaboradores (2015), que analisou o crescimento de *Candida parapsilosis* na presença de  
 2 rizoma de *Curcuma longa*, somado a sulfonamida, obtendo como resultado a ausência de  
 3 atividade sinérgica ou antagônica.

4

#### 5 **Teste de sensibilidade por disco de difusão**

6 Para este teste foram inoculados  $1,5 \times 10^8$  células/mL de *C. albicans* em placas com  
 7 meio nutriente e acrescentados discos de papel esterilizados (diâmetro de 6 mm), que foram  
 8 embebidos previamente nos extratos de *C. brasiliense* e *S. adstringens* em diferentes  
 9 concentrações, e incubadas em temperatura ambiente por 7 dias.

10



11

12 *Figura 6:* Teste feito com discos de difusão, embebidos em extrato metanólico da raiz de *S.*  
 13 *adstringens* (A) e casca de *C. brasiliense* (B), nas concentrações de 100 µg/mL, 250 µg/mL e  
 14 500 µg/mL, sobre *C. albicans*.

15

16 Após esse período pode se observar que os extratos de *C. brasiliense* e *S. adstringens*  
 17 (figura 6) não apresentaram atividade inibitória sobre o crescimento do fungo, não sendo  
 18 formado, então, halo de inibição.

19

20 Passos e colaboradores (2002), determinaram a atividade antifúngica de diferentes  
 21 constituintes do *C. brasiliense* contra o fungo *Cryptococcus neoformans*. Nesse estudo  
 22 observou-se que a cera epicuticular da folha foi a parte que apresentou mais atividade  
 antifúngica, inibindo o crescimento de até 91,3% dos isolados de *C. neoformans*.

1 Emerenciano (2017), em seu estudo avaliou a atividade antimicrobiana do óleo de  
2 pequi extraído artesanalmente no laboratório e do óleo comercial, ambos os óleos não  
3 apresentaram halo de inibição significantes para as bactérias *Staphylococcus aureus* e  
4 *Escherichia coli*, sendo elas resistentes aos óleos testados.

5 Pinho e colaboradores (2012), demonstrou em seu estudo que o extrato hidroalcoólico  
6 do farelo da casca do pequi não inibiu o crescimento bacteriano para *Staphylococcus aureus* e  
7 *Escherichia coli*. Neste mesmo estudo o extrato hidroalcoólico das folhas do barbatimão  
8 inibiu o crescimento de *S. aureus*, já a *E. coli* mostrou-se resistente ao mesmo extrato.

## 9 10 **CONCLUSÃO**

11 De posse dos resultados obtidos no teste de determinação da concentração inibitória  
12 mínima, não foi possível determinar os valores de CIM para os extratos de *C. brasiliense* e *S.*  
13 *adstringens*. Resultados esses que quando, somando aos resultados encontrados nos demais  
14 testes apresentados neste estudo, permitem concluir que tanto o extrato de *C. brasiliense*,  
15 quanto o extrato de *S. adstringens* não apresentaram atividade antiproliferativa sobre o  
16 crescimento do fungo *C. albicans*, o que não evidencia potencial antifúngico dos extratos  
17 avaliados, segundo as metodologias realizadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, K.L.; SILVA, L.P.; **Atividade inibitória de *Handroanthus serratifolius* (bignoniaceae) sobre *Candida albicans***. Refacer. v.4, n.2, 2015.

AMARAL, L.R.F.B. **Avaliação da segurança e eficácia do extrato de *Caryocar brasiliense* obtido por CO<sub>2</sub> supercrítico e sua aplicação como ativo para formulações antissépticas**. 2014. 185 f. Tese (Doutorado Ciências Médicas) - Universidade de Campinas, São Paulo, SP, 2014.

ÁLVARES, C.A.; SVIDZINSKI, T.I.E.; CONSOLARO, M.E.L. **Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras**. J. Bras. Patol. Med. Lab., v.43, n.5, p.319-327, 2007.

BARBEDO, L.S.; SGARBI, D.B.G. **Candidíase**. DST – J. Bras. Doenças Sex. Transm., v.22, n.1, p.22-38, 2010.

BAUER, A.W. et al. **Antibiotic Susceptibility Testing by a Standartized Single Disc Method**. Am. J. Clin. Pathol. v.45, n.4, p.493-496, 1966.

BETONI, J.E.C. et al. **Synergism Between Plant Extract and Antimicrobial Drugs Used on *Staphylococcus aureus* diseases**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.101, n.4, p.387-390, 2006.

BREDA, C.A. et al. **Phytochemical analysis and antifungal activity of extracts from leaves and fruit residues of brazilian savanna plants aiming its use as safe fungicides**. Rev. Nat. Prod. Bioprospect. v.06, p.195-204, 2016.

CARVALHO, L. S.; PEREIRA, K. F.; DE ARAÚJO, E. G. **Características botânicas, efeitos terapêuticos e princípios ativos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*)**. Arq. Cienc. Saúde UNIPAR, Umuarama, v.19, n.2, p.147-157, 2015.

CARVALHO, R.J.V. et al. **IGA, IGE e subclasses de IGG anti-*candida albicans* no soro e lavado vaginal de pacientes com candidíase vulvovaginal**. Rev. Assoc. Med. Bras, v.49, n.4, p.434-438, 2003.

CORRÊA, M.F.P.; MELO, G.O.; COSTA, S.S. **Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da Asma**. Rev. Bras. Farmacogn. v.18, p.785-797, 2008.

COSTA, C.R. **Fatores de virulência de isolados de candida de pacientes imunocomprometidos. Caracterização molecular de *Candida albicans* suscetíveis e**

**resistentes ao fluconazol.** 2009. 94 f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2009.

**COSTA, F.I.B. Caracterização e avaliação da atividade antioxidante de farinhas produzidas a partir dos resíduos de Umbu (*Spondias tuberosa* Arruda Cam.) e Maracujá do Mato (*Passiflora cincinnata* Mast.).** 2013. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento) Ciências Ambientais - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA, 2013.

**COUTO, E.M.P.; CARLOS, D.; MACHADO, E.R. Candidíase em neonatos uma revisão epidemiológica.** 2011. Ensaio em Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde, v.15, n.4, p.197-213, 2011.

**DALAZEN, D. et al. Comparação do perfil de suscetibilidade entre isolados clínicos de *Candida* spp. orais e vulvovaginais no Sul do Brasil.** J. Bras. Patol. Med. Lab., v.47, n.1, p.33-38, 2011.

**EMERENCIANO, N M J. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo de Pequi extraído artesanalmente (*Caryocar* sp.)** (2016) TCC (Bacharelado em Nutrição) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Bacharelado em Nutrição. Vitória de Santo Antão, PE, 2016.

**FARIA, M.R.G. et al. Avaliação da capacidade antifúngica de mel e geopropolis de *Melipona quadrifasciata* sobre *Candida albicans*.** Refacer. v.6, n.1, 2017.

**FERREIRA, E.C.; SILVA, J.L.L.; SOUZA, R.F. As propriedades medicinais e bioquímicas da planta *Stryphnodendron adstringens* “barbatimão”.** Persp. online: biol. & saúde, Campos dos Goytacazes, v.11, n.3, p.14-32, 2013.

**GIOLO, M.P.; SVIDZINSKI, T.I.E.S. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia.** J Bras. Patol. Med. Lab. v.46, n.3, p.225-234, 2010.

**GLASENAPP, J.S. Variação aloenzimática e estrutura genética populacional de *S. adstringens* (mart) coville (leguminosae).** 2011. 103 f. Tese (Doutorado em ciência) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2011.

**GOULART, S.L.; Características anatômicas, químicas e densidade do barbatimão.** 2010. 118 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia da Madeira) - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2010.

HENRIQUES, B.O. et al. ***In Vitro* TNF- $\alpha$  Inhibitory Activity of Brazilian Plants and Anti-Inflammatory Effect of *Stryphnodendron adstringens* in an Acute Arthritis Model.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v.2016, 2016.

KIM, K.H.; **Antifungal and synergistic effects of an ethyl acetate extract of the edible brown seaweed *Eisenia bicyclis* against *Candida species*.** Fisheries and Aquatic Sciences 17: 209-214, 2014.

LIMA, T.C.D. et al. **Breve revisão etnobotânica, fitoquímica e farmacologia de *Stryphnodendron adstringens* utilizada na Amazônia.** Rev. Fitos, RJ, v.10, n.3, p.220-374, 2016.

LUIZ, R.L.F et al. **Proanthocyanidins polymeric tannin from *Stryphnodendron adstringens* are active against *Candida albicans* biofilms.** BioMed Central Complementary and Alternative Medicine, v.15, n.68, p.1-11, 2015.

MAYER, F.L.; WILSON, D.; HUBE, B. ***Candida albicans* pathogenicity mechanisms.** Virulence, v.4, n.2, p.119-128, 2013.

MARQUES M.C.S. et al. **Efeito fungitóxico dos extratos de *Caryocar brasiliense* camb. sobre os fungos *Botrytis cineria*, *Colletotrichum truncatum* e *Fusarium oxysporum*.** Ciênc. agrotec., Lavras. Edição Especial, p.1410-1419, dez., 2002.

MELO, J.A. **Valorização da flora do Cerrado com importância medicinal.** 2011. Monografia (Licenciatura em Ciências Biológicas) - Universidade de Brasília, Luziânia, 2011.

MENEZES, E.A. et al. **Perfil de susceptibilidade de *Candida tropicalis* a antifúngicos sistêmicos.** Revista Patologia Tropical, v. 42, n. 1, p. 49-55, 2013.

MENEZES, E.A. et al. **Isolamento de *Candida spp.* no mamilo de lactantes do Banco de Leite Humano da Universidade Federal do Ceará e teste de susceptibilidade a antifúngicos.** J. Bras. Patol. Med. Lab, v.40, n.5, p.299-305, 2004.

MENEZES, E.A. et al. **Identificação Molecular e suscetibilidade antifúngica de *Candida parapsilosis* isoladas no Ceará, Brasil.** J. Bras. Patol. Med. Lab., v.48, n.6, p.415-420, 2012.

MIRANDA-VILELA, A.L.; RESCK, I.S.; GRISOLIA, C.K. **Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp.** Genetics and Molecular Biology, v.31, n.4, p.956-963, 2008.

National Committee for Clinical Laboratory Standards, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*; Twelfth Informational Supplement M100-S12 22, 2002.

PACHECO, D.R. et al. 2015. **Avaliação da atividade antifúngica de *Curcuma longa* sobre *Candida parapsilosis***. Rev. Patol. Trop., v.44, n.3, p.258-270, 2015.

PASSOS, X.S. et al. **Antifungal activity of *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) against *Cryptococcus neoformans***. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. v.35, n.6, p.623-627, 2002.

PAULA JÚNIOR, W. **Atividades biológicas in vitro de extratos hidroetanólicos de folhas e do mesocarpo interno de *Caryocar brasiliense* Cambess.** 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

PEIXOTO, J.V. et al. **Candidíase - uma revisão de literatura**. Bra. Jour. of Surg. and Clin. Res. v.8, n.2, p.75-82, 2014.

PEREIRA, D.C. **Levantamento epidemiológico da Candidíase vulvovaginal em laudos citopatológicos realizados durante seis anos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil**. Rev. de Pat. Trop., v.41, n.2, p.163-168, 2012.

PINHO L. et al. **Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim- pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi**. Revista Ciência Rural, v.42, n .2, p 323-331, 2012.

PRADO, R.S. et al. **Inhibition of *Paracoccidioides lutzii* Pb01 isocitrate lyase by the natural compound argentilactone and its semi-synthetic derivate**. Plosone v.9, n.4, p.11-13, 2014.

ROESLER, R. et al. **Antioxidant activity of cerrado fruits**. Ciênc. Tecnol. Aliment., v.27, n.1, p.53-60, 2007.

SANTANA, D.P. et al. **Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans***. Rev. Ciênc. Méd. Biol., v.12, n.2, p.229-233, 2013.

SILVA, H.M. **Caracterização e identificação de leveduras do gênero *Candida* em pacientes transplantados de medula óssea**. 2011. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical e Saúde Pública) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2011.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento.** PORTO ALEGRE. EFRGS, 2007.

SOUZA T.M. et al. **Avaliação da atividade anti-séptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato.** Rev. Bras. Farmacogn., v.17, n.1, p.71-75, 2007.

TAIRA, D.L. **Atividade enzimática e susceptibilidade antifúngica de *Candida spp.* isoladas de pacientes com candidemia em hospital universitário de Campo Grande-MS, 1998-2010.** 2011. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2011.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia.** Porto Alegre, Artmed, 2012.

VASCONCELOS, M.C.A et al. **Avaliação de atividades biológicas das sementes de *Stryphnodendron obovatum benth* (Leguminosae).** Rev. Bras. Farmacogn., v.14, n.1, p.121-127, 2004.

VERA, R. et al. **Caracterização física e química de frutos do pequizeiro (*Caryocar brasiliense Camb.*) oriundos de duas regiões no estado de Goiás, Brasil.** Pesq. Agropec. Trop., v.37, n.2, p.93-99, 2007.