



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE ODONTOLOGIA**

TEREZA KARLA VIEIRA LOPES DA COSTA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME DO EXTRATO DAS FOLHAS DA
Guapira graciliflora Mart. CONTRA ESPÉCIES DE *CANDIDA*: ESTUDO *in vitro*.**

**CAMPINA GRANDE
2017**

TEREZA KARLA VIEIRA LOPES DA COSTA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME DO EXTRATO DAS FOLHAS DA
Guapira graciliflora Mart. CONTRA ESPÉCIES DE *CANDIDA*: ESTUDO *in vitro*.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Odontologia.
Área de concentração: Odontologia

Orientador: Edja Maria Melo de Brito Costa

**CAMPINA GRANDE
2017**

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.

C837a Costa, Tereza Karla Vieira Lopes da.

Atividade antifúngica e antibiofilme do extrato das folhas da *Guapira graciliflora* Mart. contra espécies de *Candida* [manuscrito]
: Estudo in vitro / Tereza Karla Vieira Lopes da Costa. - 2017.
20 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia)
- Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2017.

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

1. *Candida albicans*. 2. Biofilme dentário. 3. *Guapira graciliflora* Mart. I. Título.

21. ed. CDD 615.321

TEREZA KARLA VIEIRA LOPES DA COSTA


ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME DO EXTRATO DAS FOLHAS DA
Guapira graciliflora Mart. CONTRA ESPÉCIES DE *CANDIDA*: ESTUDO *in vitro*.

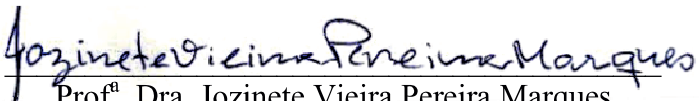
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

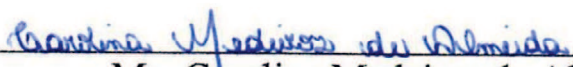
Área de concentração: Odontologia.

Aprovada em: 08/02/2017

BANCA EXAMINADORA


Prof.^a Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa (Orientadora)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)


Prof.^a Dra. Jozinete Vieira Pereira Marques
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)


Ma. Carolina Medeiros de Almeida
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

À minha mãe e minha irmã, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter sempre me abençoado, por ter permitido realizar esse sonho, por ser minha fortaleza nos momentos mais difíceis ao longo desses cinco anos. À Maria, minha intercessora.

À minha mãe, por tudo que sempre fez por mim, por sua renúncia, amor, companheirismo, força, apoio. À minha irmã Nathália, que mesmo com todas as nossas brigas, sempre esteve ao meu lado.

À vovó Tereza, por todas as suas orações, seus carinhos, por sempre me fazer sentir em paz. À tia Coca, minha segunda mãe, por ter me ajudado nos momentos que eu mais precisei em Campina. A tio Ivon, por ter acreditado em mim, ter me dado a chance de crescer e nunca duvidar que eu chegaria até esse momento.

Ao meu avô Genildo, meu pai, quem sempre cuidou de nós três, que sempre se preocupou e que torceu por mim desde sempre.

A todos os meus familiares que torceram por mim, que vibraram com cada conquista minha, que me deram força nas adversidades.

Ao meu amor Rodrigo, por todo companheirismo, cumplicidade, atenção e por sempre me incentivar a dar o meu melhor em tudo o que fizer. Por ter ficado tantas noites ao meu lado, muitas vezes estudando comigo. Obrigada por tudo, te amo!

À minha duplinha Arella. Amiga, eu só tenho a agradecer a Deus por ter te colocado em minha vida, pela nossa amizade, pelas caronas, por tudo que vivemos e aprendemos nesses 5 anos.

A todos os meus amigos, em especial os que estiveram diariamente presentes nos últimos anos, em especial as meninas: Arella, Laíza, Livia, Thayná, Priscilla, Cinthya, Mariana, Bianca. À Estela, pela convivência, pela amizade.

À minha orientadora professora Dra. Edja, por ter me acolhido tão bem em seu grupo, por me entender, aconselhar sempre que precisei. A todo o meu grupo de pesquisa: Érika, Rennaly, Diego, Carol, Yane, Arella, Paolla e Priscilla. Hoje eu sei o que é trabalhar em equipe, crescer juntos. Vou deixar o grupo de coração partido.

Ao professor Gustavo Godoy, que abriu as portas da Iniciação Científica para mim e permitiu viver a experiência de aprender novos conhecimentos no CPqBA Campinas.

A todos os professores, técnicos, paciente, obrigada por tudo.

“Meu refúgio, minha fortaleza, meu Deus, eu confio em ti” (Sl 90, 1)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	METODOLOGIA	8
2.1	Local e Tipo do Estudo.....	8
2.2	Material Vegetal e Obtenção do Extrato.....	8
2.3	Caracterização do Potencial Antifúngico.....	9
2.3.1	<i>Microrganismos</i>	9
2.3.2	<i>Preparo do Inóculo</i>	9
2.3.3	<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)</i>	9
2.3.4	<i>Leitura da Concentração Inibitória Mínima (CIM)</i>	10
2.3.5	<i>Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)</i>	10
2.4	Atividade anti-biofilme.....	10
2.4.1	<i>Superfície de adesão do biofilme</i>	11
2.4.2	<i>Preparo do Inóculo</i>	11
2.4.3	<i>Inibição da Formação do Biofilme</i>	11
2.4.4	<i>Quantificação de Células Viáveis do Biofilme Residual</i>	12
2.4.5	<i>Avaliação da Atividade Metabólica</i>	12
3	RESULTADOS	12
3.1	Atividade Antifúngica.....	12
3.2	Atividade Antibiofilme.....	13
4	DISCUSSÃO	15
5	CONCLUSÕES	16
	ABSTRACT	17
	REFERÊNCIAS	17

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME DO EXTRATO DAS FOLHAS DA
Guapira graciliflora Mart. CONTRA ESPÉCIES DE *CANDIDA*: ESTUDO *in vitro*.

Tereza Karla Vieira Lopes Da Costa

RESUMO

A Candidíase oral é uma infecção fúngica oportunista causada por espécies por gênero *Candida*. Em virtude do risco de candidemia em pacientes imunocomprometidos e do aumento da resistência desses microrganismos aos antifúngicos convencionais, surge a necessidade de novas soluções terapêuticas, sendo as plantas medicinais uma alternativa de tratamento. O presente estudo avaliou a atividade antifúngica e antibiofilme do extrato das folhas da *Guapira graciliflora* Mart. A atividade antifúngica do extrato foi analisada através da técnica de microdiluição em caldo, com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente às cepas *Candida albicans* ATCC 10231; *Candida dubliniensis* CBS 7889; *Candida glabrata* CBS 07; *Candida krusei* CBS 573. A capacidade em inibir a formação de um biofilme de *C. albicans* foi avaliada considerando o número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e a atividade metabólica (MTT) nas concentrações CIM (125 µg/mL), 10 vezes a CIM (1250 µg/mL) e 100 vezes a CIM (12500 µg/mL). O extrato apresentou moderada atividade antifúngica sobre *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei* e forte atividade sobre *C. dubliniensis*. A concentração 12500 µg/mL foi a mais efetiva em reduzir o número total de células e atividade metabólica da *C. albicans*, mantendo 44,4% e 42,9% do número de UFC/mL de *C. albicans* viáveis e 34,6% e 52% das células ativas, nos períodos de 24 e 48 horas, respectivamente. O extrato mostrou ter atividade antifúngica frente às leveduras testadas. Para comprovação da sua eficácia e segurança no tratamento da candidíase, fazem-se necessários a realização de estudos clínicos.

Palavras-chaves: *Candida albicans*; biofilme dentário; *Guapira graciliflora* Mart.

1 INTRODUÇÃO

A candidíase oral é uma infecção causada por fungos do gênero *Candida*, comumente presentes na microbiota da cavidade oral, sendo a espécie *Candida albicans* a mais associada à infecção (CASTRO; LIMA, 2010). Tais espécies estão presentes na cavidade oral de aproximadamente 50% da população e, de maneira geral, não causam doença, pois vivem como microrganismos comensais do organismo (SALERNO et al., 2011). Sua transição para a forma patogênica ocorre devido a um desequilíbrio entre a imunidade do hospedeiro e o crescimento da levedura (FERREIRA et al, 2015).

A *C. albicans* atua desde a colonização das mucosas até o comprometimento de órgãos sistêmicos, (STRAMANDINOL et al, 2010), podendo se manifestar na forma aguda e crônica (SIMÕES et al, 2013). A infecção por *Candida* pode clinicamente manifestar-se como placas amolecidas, esbranquiçadas, facilmente removidas da mucosa oral e do dorso da língua, caracterizando a candidíase pseudomembranosa. Uma outra forma clínica bastante comum é a

candidíase eritematosa, geralmente, associada ao uso de prótese total mal higienizada, denominada de estomatite protética, podendo atingir cerca de 70% dos usuários de prótese dentária (WONG et al, 2014).

A incidência de infecções por cândida tem aumentado de maneira considerável, provavelmente em decorrência do crescente número de pacientes imunocomprometidos, da utilização indiscriminada de antibióticos, bem como do surgimento de infecções provocadas por espécies não-*albicans*, como *Candida tropicalis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida krusei* e *Candida dubliniensis*, (CANTÓN et al, 2011), relacionadas a um maior índice de mortalidade e de resistência aos antifúngicos convencionais (ORTEGA et al, 2011, SILVA et al., 2012).

Considerando o aumento da resistência de microrganismos patógenos às drogas antimicrobianas, o que ocasiona infecções cada vez mais severas e persistentes, observa-se a necessidade da busca de novas soluções terapêuticas de combate a estes microrganismos, de maneira eficiente (GUIMARÃES; MOMESSO, 2010). Assim, surge o interesse para a pesquisa com plantas medicinais, uma vez que estas configuram-se como uma importante fonte de compostos ativos para o desenvolvimento de novas drogas eficazes e seguras (NASCIMENTO et al,2012).

Dentre as plantas medicinais destaca-se a *Guapira graciliflora* Mart. pertencente à família *Nyctaginaceae*, conhecida popularmente como João-mole, pau-mole, João dormido, pau-piranha (COELHO et al, 2005). Pode ser encontrada na Caatinga, principal bioma do semiárido brasileiro (CHAVES et al,2013). É utilizada popularmente como cicatrizante, com ação anti-inflamatória e no tratamento da tuberculose (COELHO et al., 2005; PAVAN et al., 2009). No entanto, poucos estudos foram realizados para analisar a atividade antimicrobiana dessa planta (ROCHA *et al.*, 2013).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar *in vitro* a ação antifúngica e antibiofilme do extrato hidroalcolólico das folhas da *G. graciliflora* sobre espécies de *Candida*.

2 METODOLOGIA

2.1 Tipo e Local de estudo

Trata-se de um estudo experimental *in vitro* realizado na Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande, Paraíba e no Centro de Pluridisciplinar de Pesquisa Químicas Biológicas e Agrícolas (CPQBA- Unicamp), Campinas, São Paulo.

2.2 Material Vegetal e Obtenção do Extrato

As folhas da *G. graciliflora* foram coletadas no município de Queimadas (7° 21 30 " S, 35° 53' 54" W), Paraíba. O material foi limpo, acondicionado em sacos de papel e secos em estufa de ar circulante (FANEM ®, modelo 330) a temperatura de 40°C até a obtenção de peso constante. O espécime testemunho da planta está depositado na coleção do Herbário Manoel Arruda Câmara (ACAM), da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), no município de Campina Grande, Paraíba, sob o registro n° 907/ACAM.

A obtenção do extrato ocorreu pelo método de maceração na proporção de 200 gramas da planta seca e moída para 1 litro de álcool etílico a 50%. Após este processo, o álcool foi removido por evaporação à vácuo (Quimis® / Q344M) e a porção residual liofilizada (Labconco®/Freezone 4.5).

2.3 Caracterizações do Potencial Antifúngico

2.3.1 Microrganismos

Foram utilizadas as seguintes linhagens de *Candida*: *C. albicans* ATCC 10231; *C. dubliniensis* CBS 7889, *C. glabrata* CBS 07 e *C. krusei* CBS 573 e

2.3.2 Preparos do Inóculo

Culturas de leveduras de 24 horas foram adicionadas em 5 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9%), regulando-se sua absorbância entre 0,08 a 0,10 a 530 nm, afim de obter uma densidade equivalente a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL. Diluições seriadas em meio de cultura RPMI-1640 (Angus Buffers & Biochemicals, Niagara Falls, NY, USA) foram realizadas, de modo que, ao final, obtivesse uma densidade de $5,0 \times 10^3$ UFC/mL. Nos poços da microplaca, a solução final apresentou uma concentração de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL (protocolo M27-A3, CLSI,2008).

2.3.3 Determinações da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato foi realizada através da técnica da microdiluição em caldo, utilizando microplacas para microdiluição, contendo 96 poços (8 linhas A-H/ 12 colunas). Inicialmente, foram depositados 100 µL/poço do meio de cultura RPMI-1640. Adicionou-se em seguida 100 µL/poço do extrato de *G. graciliflora*, diluídos em meio de cultura RPMI-1640 e 10% de DMSO. Para realizar a microdiluição, 100 µL foram transferidos do primeiro poço para o seguinte, repetindo-se esse procedimento até o último poço, obtendo-se concentrações entre 2000 e 0,4882. Os 100 µL finais foram desprezados. Posteriormente, 100 µL da suspensão do microrganismo de 24 horas foram adicionados (5×10^3 UFC/mL). As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C, em atmosfera aeróbia (CLSI 2008). Os ensaios foram realizados em duplicata, em dois experimentos diferentes.

A Nistatina (0,5 mg/mL) (Sigma-Aldrich®) foi utilizada como controle positivo. Foram analisados a esterilidade do meio de cultura e o controle de crescimento do microrganismo.

2.3.4 Leitura da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Após o período de incubação, verificou-se a ocorrência de alteração de coloração do meio RPMI-1640, de rosa (cor original) para amarelo, indicativo de mudança do potencial hidrogeniônico (pH), ocasionada pelo crescimento microbiano (CLSI, 2008).

Para classificação da atividade antimicrobiana do extrato foram utilizados os parâmetros estabelecidos por Holetz et al (2002), considerando: CIM < 100 µg/mL – forte atividade; CIM entre 100 e 500 µg/mL – atividade moderada; CIM entre 500 e 1000 µg/mL – fraca atividade e CIM > 1000 µg/mL – ausência de atividade.

2.3.5 Determinações da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Para determinar a atividade fungicida, uma alíquota de 50 µL de cada poço, com concentrações igual e maiores que a CIM, foram subcultivadas em meio ágar sabouraud dextrose (Merck®) e incubadas a 37°C por 48 horas. As CFMs foram definidas como a menor concentração que inibiu o crescimento visível do microrganismo (CLSI, 2008).

A razão CFM / CIM foi calculada para determinar se o extrato apresenta uma atividade fungistática (CFM / CIM \geq 4) ou fungicida (CFM/CIM <4) (SIDDIQUI et al, 2013)

2.4 Atividade anti-biofilme

2.4.1 Superfícies de adesão do biofilme

Foram utilizados discos de resina acrílica incolor, quimicamente polimerizada (Vipi Flash VIPI Produtos Odontológicos Ltda., Pirassununga, SP, Brasil), de dimensões 10x10x5mm como superfícies de adesão para o biofilme. Os discos foram preparados de acordo com as instruções do fabricante (25°C, em proporções iguais de pó e líquido, sem incorporação de bolhas de ar) e em seguida foram imersos em água purificada a uma temperatura de 37°C por 24 horas para liberação de monômero residual. As superfícies dos discos receberam acabamento e polimento; em seguida foram desinfetados em água ultra purificada e álcool etílico 70%, com o auxílio de equipamento de ultrassom, durante 20 minutos (FREITAS-FERNANDES et al., 2014).

2.4.2 Preparos do Inóculo

Uma cultura de *C. albicans* ATCC 10231 foi reativada em ágar sabouraud dextrose e incubada por 24 horas a 37°C. As células foram suspensas em sabouraud dextrose caldo (Himedia®). A concentração da suspensão microbiana foi determinada utilizando-se a câmara de Newbauer (KASVI®) com obtenção de uma densidade celular de 2×10^5 UFC/mL.

2.4.3 Inibições da Formação do Biofilme

Inicialmente, cada disco de resina foi colocado em um poço de uma placa de cultura de 24 poços (KASVI® 24 well Tissue Culture Plate), contendo 1mL de inóculo da levedura (1×10^5 UFC/mL) e 1 mL do extrato diluído em meio de cultura, suplementado com glicose 1% nas seguintes concentrações: CIM (125 µg/mL), 10 vezes a CIM (1250 µg/mL) e 100 vezes a CIM (12500 mg/mL). As placas foram incubadas por 2 horas a 37°C (LABOR® SP-200). Como controle positivo utilizou-se nistatina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich®). Para verificar o controle de crescimento, o inóculo foi colocado de forma individualizada na placa.

Decorridas as 2 horas iniciais, os discos de resina foram transferidos para uma nova placa de 24 poços (KASVI® 24 well Tissue Culture Plate), contendo 2mL/poço de meio de cultura sabouraud dextrose caldo, suplementado com glicose 1%, sendo uma incubada por 24 horas e outra por 48 horas, a 37° C. Após cada período, os discos foram lavados em solução salina de NaCl a 0,9% e transferidos para tubos de ensaio contendo 2 mL contendo a mesma solução.

O biofilme dos discos foi removido através de um agitador de tubos (KASVI®, Vortex Mixer K45-2810), por 30 segundos, obtendo-se uma suspensão do biofilme. Esta foi utilizada para quantificação de células viáveis (UFC/mL) e avaliação da atividade metabólica da *C. albicans*. O ensaio foi realizado em quadruplicata.

2.4.4 Quantificações de Células Viáveis do Biofilme Residual

A suspensão do biofilme obtida passou por diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}) e uma alíquota de 10 μ L de cada diluição foi plaqueada em triplicata em meio ágar sabouraud dextrose (Himedia®). As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após esse período, as unidades formadoras de colônia foram quantificadas e os resultados expressos em UFC/mL (FREITAS-FERNANDES et al., 2014).

2.4.5 Avaliações da Atividade Metabólica

A atividade metabólica foi avaliada utilizando-se o método do MTT (brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich® - Brometo Tiazolil Azul de Tetrazólio). Da suspensão de células do biofilme, 1 mL foi centrifugada a 1500 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado; adicionou-se ao pellet 200 μ L de MTT, a uma concentração 0,5mg/mL. As células foram incubadas por 3 horas, a 37° C. Após este período, a solução de MTT foi novamente centrifugada, o sobrenadante descartado e adicionado ao pellet 200 μ L de DMSO. Esta solução foi encubada por mais 15 minutos e em seguida foi realizada a leitura da absorbância em leitor de microplacas (Biochrom®, EZ Reader 400 Microplate Reader), com comprimento de onda de 570nm (OLIVEIRA et al., 2014).

3 RESULTADOS

3.1 Atividade Antifúngica

O extrato das folhas da *G. graciliflora* apresentou atividade antifúngica moderada sobre as espécies de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata* e forte atividade sobre a *C. dubliniensis*, não apresentando atividade fungicida em relação às concentrações testadas.

Tabela 1: Distribuição dos valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Fungicida Mínima (CFM) e razão CFM/CIM do extrato da *G. graciliflora*, de controle positivo, de acordo com a espécie de *Candida*.

LEVEDURAS	<i>G. graciliflora</i>			NISTATINA		
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CFM ($\mu\text{g/mL}$)	CMF/CIM	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CFM ($\mu\text{g/mL}$)	CFM/CIM
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	125 $\mu\text{g/mL}$	>2000	>16	0,9765 $\mu\text{g/mL}$	-	*
<i>C. dubliniensis</i> CBS 7889	3,90625 $\mu\text{g/mL}$	>2000	>512	0,9765 $\mu\text{g/mL}$	-	*
<i>C. glabrata</i> CBS 07	250 $\mu\text{g/mL}$	>2000	>8	0,9765 $\mu\text{g/mL}$	-	*
<i>C. krusei</i> CBS 573	125 $\mu\text{g/mL}$	>2000	>16	0,9765 $\mu\text{g/mL}$	-	*

CFM/CIM <4 = Fungicida
CFM/CIM \geq 4 = Fungistática

3.2 Atividade anti-biofilme

A capacidade do extrato da *G. graciliflora* em inibir a formação do biofilme foi verificada através da contagem de células viáveis expressas em UFC/mL de *C. albicans* (Figura 1) e em porcentagem em função do controle de crescimento (Figura 2), após os períodos de 24 e 48 horas.

A concentração correspondente a 100 vezes a CIM (12500 $\mu\text{g/mL}$) apresentou uma maior redução do total de células, mantendo 44,4% e 42,9% do número de UFC/mL de *C. albicans* viáveis nos períodos de 24 horas e 48 horas, respectivamente, em relação ao controle de crescimento.

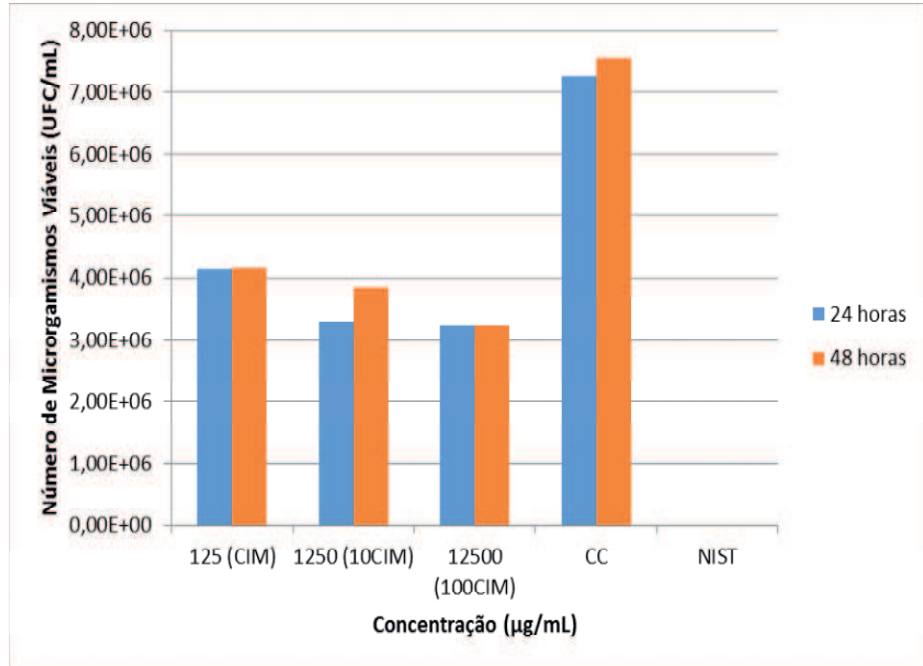


Figura 1: Distribuição do número de células viáveis expressas em UFC/mL de *C. albicans*, conforme a concentração do extrato da *G. graciliflora* e o período de tempo.

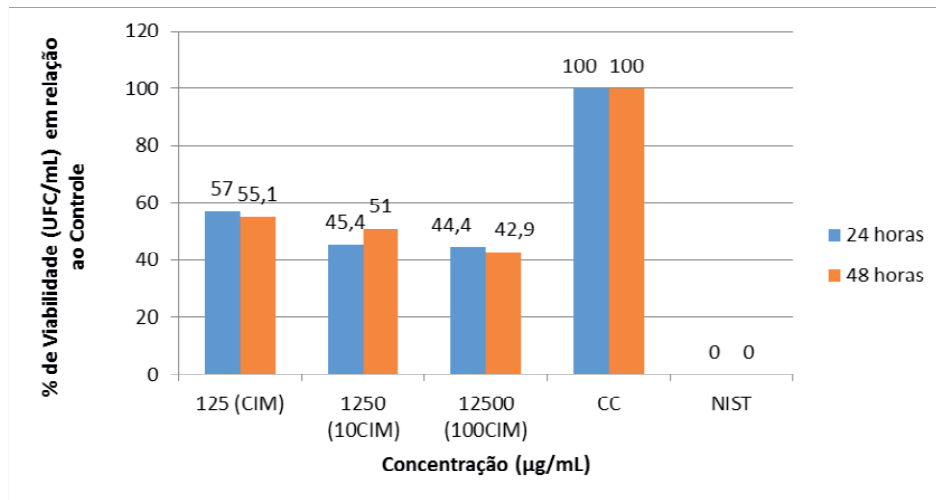


Figura 2: Distribuição do percentual de células viáveis de *C. albicans* em função do controle de crescimento, conforme a concentração do extrato da *G. graciliflora* e o período de tempo.

A concentração correspondente a 100 vezes a CIM (12500µg/mL) também foi a concentração mais efetiva em reduzir a atividade metabólica total, mantendo 34,6% e 52% das células de *C. albicans* ativas, nos períodos de 24 horas e 48 horas, respectivamente, em relação ao controle de crescimento (Figura 3).

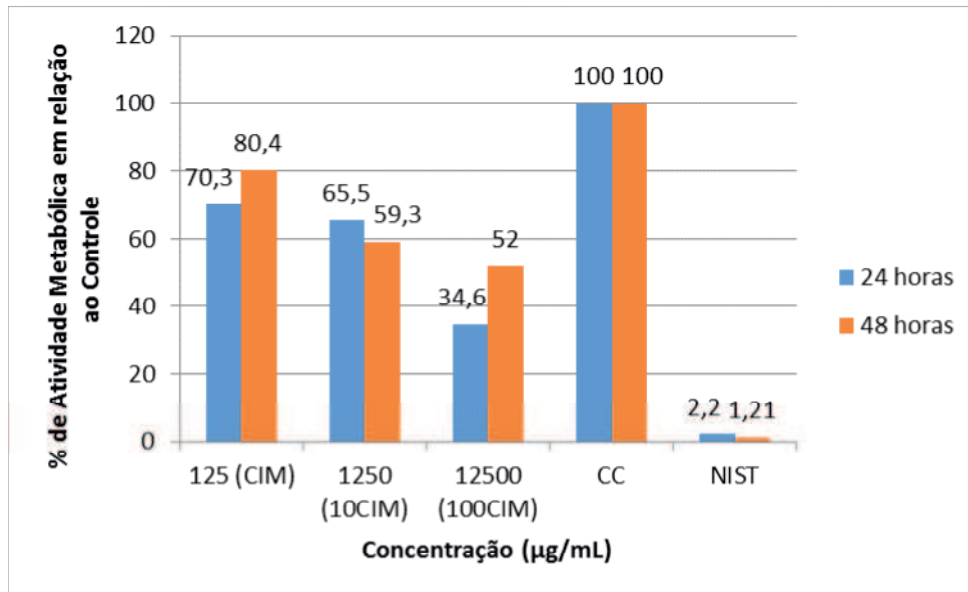


Figura 3: Distribuição do percentual da atividade metabólica das células de *C. albicans*, em relação ao controle de crescimento, conforme a concentração do extrato da *G. graciliflora* e o período de tempo.

4 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, a utilização excessiva de antimicrobianos favoreceu a resistência de algumas espécies aos agentes antifúngicos convencionais, ocasionando um problema de saúde pública (SWEENEY et al, 2004, ZARDO; MEZZARI,2004). Assim, surge a necessidade da busca por novas alternativas terapêuticas eficientes no controle microbiológico. Nesse contexto, as plantas destacam-se como uma fonte de interesse, por apresentarem compostos químicos com efeitos antimicrobianos e constituírem novas de prevenção e tratamento das doenças (SAHOO et al, 2010; ZUO et al., 2008).

No caso da *G. graciliflora*, o extrato de suas folhas apresentou atividade antifúngica moderada sobre as espécies de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata*, de acordo com a classificação de Holetz et al (2002) e forte atividade sobre a *C. dubliniensis*. Esses resultados tornam-se relevantes, uma vez que principalmente as espécies de *Candida* não-*albicans* apresentam uma maior resistência aos antifúngicos tradicionais, ocasionando infecções mais graves principalmente em paciente imunocomprometidos (BARBEDO; SGARBI, 2010), afetando a cavidade oral, orofaringe, esôfago e podendo ser disseminar para a corrente sanguínea (PORTELA et al.,2016).

O extrato apresentou perfil fungistático, inibindo o crescimento visível do microrganismo, sem causar sua morte. Esses resultados são positivos considerando que a

microbiota oral deve ser controlada e não eliminada, evitando o desequilíbrio causado por substâncias fungicidas, direcionando a busca por agentes efetivos, impedindo o avanço da infecção (KATAOKA et al, 2001).

A formação dos biofilmes apresenta um papel de destaque na patogênese da candidíase, sendo a espécie considerada de maior prevalência em relação as demais (WONG et al., 2014) em função da expressão de fatores de virulência, que desempenham um papel essencial na gênese do processo infeccioso (RIBEIRO et al,2008). Dentre esses fatores, destacam-se a capacidade de diferenciação de levedura para hifa (dimorfismo), expressão de fatores de adesão, produção de toxinas e a secreção de enzimas hidrolíticas como as proteinases e fosfolipases, viabilizando o crescimento da levedura na forma de biofilme sobre uma variedade de superfícies (HARTMANN et al, 2016).

Utilizando o protocolo adotado, pode-se notar que todas as concentrações do extrato testadas foram capazes de causar a redução da viabilidade celular e a atividade metabólica. No entanto, a concentração 100 vezes a CIM (12500µg/mL) foi a que obteve os melhores resultados. A redução do metabolismo das células do biofilme tratado com o extrato da *G. graciliflora*, verificada no ensaio do MTT, pode estar relacionada à diminuição do número de células de *C. albicans* viáveis (BASSO et al., 2011) ocasionado pela ação do extrato em uma concentração maior

Sabe-se que a concentração ativa de um antifúngico geralmente é maior para microrganismos organizados em biofilmes do que na sua forma planctônica. A formação dos biofilmes proporciona alta capacidade de resistência à ação de antifúngicos pela presença de uma matriz extracelular, que dificulta a penetração do fármaco no interior do mesmo e limita sua ação sobre as células fúngicas (NETT et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2014).

Este estudo revela resultados promissores em relação ao potencial antifúngico do extrato da *G. graciliflora* contra espécies de *Candida* e antibiofilme da *C. albicans*. Faz-se necessário que novos estudos sejam realizados com a finalidade de avaliar outras potencialidades do extrato.

5 CONCLUSÕES

O extrato das folhas da *G. graciliflora* apresentou atividade antifúngica, inibindo o crescimento das espécies de *Candida* e a formação do biofilme de *Candida albicans*.

ANTIFUNGIGAL AND ANTIBIOFILME ACTIVITY OF THE LEAF EXTRACT OF GUAPIRA GRACILIFLORA Mart. AGAINST CANDIDA SPECIES: IN VIRUS STUDY.

ABSTRACT

Oral Candidiasis is an opportunistic fungal infection caused by species by genus *Candida*. Due to the risk of candidemia in immunocompromised patients and the increased resistance of these microorganisms to conventional antimicrobials, the need for new therapeutic solutions arises, with medicinal plants being an alternative treatment. The present study evaluated the antifungal and antibiofilm activity of the leaves extract of *Guapira graciliflora* Mart. The antifungal activity of the extract was analyzed by means of microdilution in broth with determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) against strains *Candida albicans* ATCC 10231; *Candida dubliniensis* CBS-7889; *Candida glabrata* CBS 07; *Candida krusei* CBS 573. The capacity to inhibit the formation of a biofilm of *C. albicans* was evaluated considering the number of colony forming units (CFU / mL) and metabolic activity (MTT) at MIC (125 µg / mL) concentrations, 10 times the MIC (1250 µg / mL) and 100 times the MIC (12500 µg / mL). The extract showed moderate antifungal activity on *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei* and strong activity on *C. dubliniensis*. The concentration of 12500 µg / mL was the most effective in reducing the total number of cells and metabolic activity of *C. albicans*, maintaining 44.4% and 42.9% of the number of CFU / mL of viable *C. albicans* and 34.6 % And 52% of the active cells, in the periods of 24 and 48 hours, respectively. The extract showed antifungal activity against the yeasts tested. To prove its efficacy and safety in the treatment of candidiasis, it is necessary to carry out clinical studies.

Key-words: *Candida albicans*; Dental biofilm; *Guapira graciliflora* Mart.

REFERÊNCIAS

BARBEDO, L.S., SGARBI, D.B.G. Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v.4, n.22,p.1, 2010.

BASSO,F.G.,et al. *In Vitro* Effect of Low-Level Laser Therapy on Typical Oral Microbial Biofilms. **Brazilian Dental Journal.**, v. 22, n.6, p.502-510, 2011.

CANTÓN, E., et al.Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v.55, n.12, p.5590-5596, Dez., 2011.

CASTRO, R.D.; LIMA, E.O. Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida* spp. **Revista de Odontologia da UNESP**, Araraquara, v.39, n.3, p.179-184, 2010.

CHAVES, T. P. et al. Seasonal variation in the production of secondary metabolites and antimicrobial activity of two plant species used in Brazilian traditional medicine. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 8, p. 847-853, 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts - CLSI M27-A3, Wayne, PA, USA, v.2, n. 14, p.13, 2008.

COELHO, F. B. R. et al. Levantamento etnofarmacológico realizado na comunidade Mumbuca localizada no Jalapão – TO. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 52-55, 2005.

FERREIRA, G.L.S., et al. Does Scientific Evidence for the Use of Natural Products in the Treatment of Oral Candidiasis Exist? A Systematic Review. **Evidence-Based Complementary Alternative Medicine**, p.1-6, 2015.

FREITAS-FERNANDES, F.S., et al. Effect of daily use of an enzymatic denture cleanser on *Candida albicans* biofilms formed on polyamide and poly(methyl methacrylate) resins: An in vitro study. **Journal Prosthetic. Dentistry**, v. 112, n.6, p. 1349-1355, 2014

GUIMARÃES, D.O; MOMESSO, L. da S. PURO, M.P. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para descoberta e desenvolvimento de novo agentes. **Química Nova**, v.33, n.3, p.667-679, 2010.

HATMANN, A., MISSIO, R., HAMMAD, M.P., ALVES, I.A. Incidence of *Candida* spp. mucosal oral patients infected by Human Immunodeficiency (HIV) in Santo Angelo-RS. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecções**, v.6, n.3, 2016.

HENRIQUES, M., AZEREDO, J., OLIVEIRA R. *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*: comparison of biofilms in terms of biomass and activity. **British Journal of Biomedicine Science**, v.63, n.1, p.5-11, 2006.

HOLETZ, F.B., et al. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n.7, p.1027-1031, 2002

KATAOKA, A. P. A. G. Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microrganismos isolados de “landfarming”. 2001. 202 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

NASCIMENTO, M.S., et al. Characterisation of isoeleutherine in aqueous extract of *Eleutherine plicata* herb, iridaceae, active against *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*-*in vitro*. **International Journal of Pharmaceutical Science and Research**, v.3, n.4, p. 1096-1100, 2012.

NETT, J.E., et al. Interface of *Candida albicans* biofilm matrix-associated drug resistance and cell wall integrity regulation. **Eukaryot Cell**, v.10, n.12, p. 1660-1669, 2011.

- OLIVEIRA, J.R., et al. Control of microorganisms of oral health interest with *Arctium lappa* L. (burdock) extract non-cytotoxic to cell culture of macrophages (RAW 264.7). **Archive of Oral. Biology**, v. 59, n.8, p.808-814. 2014.
- ORTEGA, M. et al. *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. **The Journal of Hospital Infection**, v. 77, n. 2, p. 157-161, 2011.
- PAVAN, F. R. et al. *In vitro* anti-Mycobacterium tuberculosis activity of some Brazilian —Cerrado plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1b, p. 2014-206, 2009.
- PORTELA, M.B.P, et al. *Candida* species from oral cavity of HIV-infected children exhibit reduced virulence factors in the HAART era. **Microbial Pathogenesis**, v.102, 2017.
- RIBEIRO, E.L., et al. Aspectos das leveduras de *Candida* vinculadas as infecções nosocomiais. **NewsLab**, v.34, n.64, p. 15:20,2008.
- ROCHA, E.A.L.S.S., et al. Potencial antimicrobiano de seis plantas do semi-árido paraibano contra bactérias relacionadas às infecções endodônticas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.34, n.3, p. 351-355, 2013.
- SAHOO, N., MANCHIKANTI, P., DEY S. Herbal drugs: Standards and regulation. **Fitoterapia**, v.81, p.462–71. 2010
- SALERNO, C. et al. *Candida*-associated denture stomatitis. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, v.12, n.2, p.139-143, 2011.
- SILVA, M. S. P. S. et al. Study bioprospecting of medicinal plant extracts of the semiarid northeast: contribution to the control of oral microorganisms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.
- SIMÕES, R.J. et al. Infecções por *Candida spp* na Cavidade Oral. **Odontologia Clínico-Científica**, Recife, n.12, v.1, p. 19-22, jan./mar., 2013
- STRAMANDINOLI, R.T., et al. Prevalence of oral candidiasis in hospitalized patients and evaluation of risk factors. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, v.7, n.1, p.66-72, março, 2010.
- SWEENEY, L.C., DAVE, J., CHAMBERS, P.A, HERITAGE J. Antibiotic resistance in general dental practice—a cause for concern? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.53; p.567–76, 2004.
- WONG, S. S. W. et al. *In Vitro* and *In Vivo* Activity of a Novel Antifungal Small Molecule against *Candida* Infections. **Plos One**, v. 9, n. 1, p. 1-17, 2014.
- ZARDO, V., MEZZARI, A. Os antifungicos nas infeccoes por *Candida SP*. **NewsLab**, n.63, p.136-46, 2004.

ZUO, G.Y., WANG, G.C., ZHAO, Y.B., XU, G.L., HAO, X.Y., HAN J. Screening of Chinese medicinal plants for inhibition against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, p. 287-290, 2008.