



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA

VANNUTY DORNELES DE SENA CUNHA

AVALIAÇÃO DO EFEITO *IN VITRO* DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE
Anadenanthera colubrina* (VELLOZO) BRENAN FRENTE À *Candida albicans

CAMPINA GRANDE – PARAÍBA

2014

VANNUTY DORNELES DE SENA CUNHA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO *IN VITRO* DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE
Anadenanthera colubrina (VELLOZO) BRENAN FRENTE À *Candida albicans***

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), como requisito para obtenção do Título de bacharel em Farmácia.

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Raïssa Mayer Ramalho Catão

CAMPINA GRANDE – PARAÍBA

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.

C972a Cunha, Vannuty Dorneles de Sena.

Avaliação do efeito In Vitro do extrato hidroalcoólico de Anadenanthera colubrina (Vellozo) frente à Candida albicans [manuscrito] / Vannuty Dorneles de Sena Cunha. - 2014. 59 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2014.

"Orientação: Profa. Dra. Raïssa Mayer Ramalho Catão, Departamento de Farmácia".

1. Plantas Medicinais. 2. Angico. 3. Candida. I. Título.

21. ed. CDD 615.321

VANNUTY DORNELES DE SENA CUNHA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO *IN VITRO* DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE
Anadenanthera colubrina (VELLOZO) BRENAN FRENTE À *Candida albicans***

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), como requisito para obtenção do Título de bacharel em Farmácia.

APROVADA: 13 / Novembro / 2014

Maricelma Ribeiro Moraes

Prof.^a. Dr.^a. Maricelma Ribeiro Moraes (UEPB)

Examinadora

Thúlio Antunes de Arruda

Prof. Dr. Thúlio Antunes de Arruda (UEPB)

Examinador

Raissa Mayer Ramalho Catão

Prof.^a Dr.^a Raissa Mayer Ramalho Catão

(Orientadora – UEPB)

DEDICATÓRIA

Dedico a meus pais, Valter e Cacilda.

AGRADECIMENTOS

A Deus, porque me fez grandes coisas o Poderoso; e santo é o seu nome. Portanto dele, por Ele e para Ele são todas as coisas. A Ele seja a glória perpetuamente! Amém.

A minha família por completo, mas em especial a Cacilda, Valter, Karoliny, Jefferson, Maria Júlia, Maria Vitória, João Pedro e Thatiana por tudo que representam em minha vida. Vocês são a prova que Deus se manifesta no mundo através do amor, que Ele torna nossas vidas preenchidas ao momento que temos alguém para amar e ser amado.

A professora Dra. Raíssa Mayer Ramalho Catão, pela dedicação, orientação e acolhimento durante todo este período de estudo. Uma profissional exemplar que acaba tornando-se um farol para guiar os passos dos estudantes. Tenha certeza, professora, que a Senhora é exemplo e espelho pra mim.

Aos professores do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, pela generosidade em compartilhar os ensinamentos que fizeram parte da minha construção como profissional e como cidadão, em especial ao Prof. Dr. Thúlio Antunes de Arruda e a Prof^a. Dr^a Maricelma Ribeiro Moraes por terem se prontificado a examinar e avaliar este trabalho.

Aos amigos de turma Farmácia 2010.1, pelo companheirismo, amizade e parceria durante esses cinco anos de convivência, em especial a Renata, Ízola, Samara, Nadjaele, Gabriela.

Aos meus irmãos do Capítulo “Deus, Pátria e Família” nº 08 da Ordem DeMolay, por terem sido responsáveis por gargalhadas, sorrisos, choros e demonstração de total confiança desde 2010, em especial Júlio, Jamaelson, Ramon, Rodrigo, Thiago, Mateus, João Marques, Luan, Camilo, Weskley e Herbert. Nesse Capítulo aprendi a guiar minha vida a luz das Sete Velas: Amor Filiar, Reverência Pelas Coisas Sagradas, Cortesia, Companheirismo, Fidelidade, Pureza e Patriotismo.

As minhas parceiras de laboratório, Luanne Eugênia e Wilma Raianny, por nunca terem faltado comigo. Obrigado pela ajuda, paciência, confiança e amizade. Esse trabalho tem muito de vocês.

Aos meus amigos do CT Team Régis Pitbull, Luciano, Raniera, Paul Fagundes, Evaldo, Tam, Thamara, Ana Paula e Régis por todos os momentos de descontração que fizeram as preocupações da universidade serem esquecidas por um momento.

Aos Silva/Almeida, família Zé Galego, que foram responsáveis por tantos momentos de alegria, em especial a D. Ednalva, Beto, Marco Antônio, Dayana, Gabriel, Raphael e Arthur por terem recebido esse “agregado” com um abraço caloroso.

A todos que, de alguma forma, me apoiaram com gestos, palavras e sorrisos nesses 5 anos vivendo na UEPB.

Muito obrigado!

Em tempos assim, você aprende a viver de novo.
Em tempos assim, você se entrega e entrega de novo.
Em tempos assim, você aprende a amar de novo.
Tempos assim vivem se repetindo. (Dave Grohl)

AValiação DO EFEITO *IN VITRO* DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Anadenanthera colubrina* (VELLOZO) BRENAN FRENTE À *Candida albicans*

CUNHA, Vannuty Dorneles de Sena

RESUMO

O angico, nome popular na região nordeste do Brasil da *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan, é uma planta amplamente utilizada na medicina popular para o tratamento das afecções pulmonares e das vias respiratórias, coqueluche, bronquites, faringites e asma. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* frente à *Candida albicans*, determinando a atividade antifúngica, a concentração inibitória mínima (CIM) e a cinética fúngica (curva de morte). Além disso foi realizado o *screening* fitoquímico para determinação do teor de polifenóis totais, flavonoides e taninos condensados. O extrato foi obtido por percolação e os testes laboratoriais para avaliação da atividade antifúngica e da determinação da CIM foram realizados pela técnica de microdiluição em caldo. Para determinação da viabilidade das cepas ensaiadas e, assim, avaliar o efeito do extrato sobre o crescimento fúngico, utilizou-se o método experimental da cinética fúngica. Os resultados demonstraram atividade antifúngica do extrato de *A. colubrina* frente a *C. albicans*, apresentando CIM de 1,0 mg/mL. Em relação ao crescimento fúngico, observou-se que o extrato apresentou melhor tempo de ação até 6 horas de incubação e a administração da dose de reforço no tempo 4 horas conseguiu reduzir gradativamente ainda mais o número de células viáveis, apresentando semelhança com comportamento fungistático observada pela redução do número de células viáveis em comparação ao controle de crescimento. O rastreio fitoquímico determinou o teor de polifenóis totais (53,18%), flavonoides (0,28%) e taninos condensados (8,73%). Dessa forma, evidencia-se a atividade antifúngica do extrato hidroalcoólico do angico, sendo promissor o isolamento e identificação de seus compostos bioativos.

Palavras-chave: Plantas Medicinais; *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan; Angico; Antifúngico; *Candida*.

**AVALIAÇÃO DO EFEITO *IN VITRO* DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE
Anadenanthera colubrina (VELLOZO) BRENAN FRENTE À *Candida albicans***

CUNHA, Vannuty Dorneles de Sena

ABSTRACT

“Angico”, the folk name in the northeast region of Brazil of the *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan, is a vegetable largely utilized in the folk medicine for the treatment of pulmonary infections and airways, whooping cough, bronchitis, pharyngitis and asthma. This study had as objective to evaluate *in vitro* effect of the hydroalcoholic of *A. colubrina* towards the *Candida albicans*, determining the antifungal activity, the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and the fungal kinetics (death curve). Furthermore the phytochemical screening was performed to determine the total polyphenols content, flavonoids and condensed tannins. The solution was obtained by percolation and the laboratorial tests to evaluation of antifungal activity and of MIC determination were realized by the technique of broth microdilution. To determine the viability of the tested strains and, then, evaluate the effect of the solution towards the fungal growth, it was utilized the experimental method of the fungal kinetics. The results showed antifungal activity of the *A. colubrina* solution towards the *C. albicans*, presenting MIC of 1,0 mg/mL. Concerning the fungal growth, it was observed that the solution presented best time of action until 6 hours of incubation and the administration of the reinforcement dosage in the time of 4 hours was able to drastically reduce even more the number of viable cells, presenting similarities with the fungistatic behaviour observed by the reduction in the number of viable cells in comparison to the growth control. The phytochemical screening determined the contente of total polyphenols (53.18%), flavonoids (0.28%) and condensed tannins (8.73%). Showing then, the antifungal activity of hydroalcoholic solution of “angico”, being then, promising the isolation and identification of its bioactives compounds.

Keywords: Medicinal Plants; *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan; Angico; Antifungal Activity;

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 01. <i>Candida albicans</i> em Sabouraud Dextrose Agar	16
FIGURA 02. Locais e mecanismos de ação das drogas antifúngicas	19
FIGURA 03. Estrutura química da Anfotericina B	21
FIGURA 04. Estrutura química do Cetoconazol e Fluconazol	22
FIGURA 05. Árvore de <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vellozo) Brenan	27
FLUXOGRAMA 01. Esquema metodológico para o desenvolvimento da pesquisa	30
FLUXOGRAMA 02. Esquema metodológico para obtenção do extrato hidroalcoólico da casca da <i>A. colubrina</i>	31
FIGURA 06. Esquema metodológico da determinação da CIM do extrato hidroalcoólico da casca da <i>A. colubrina</i> pela técnica da microdiluição em placa	35
FLUXOGRAMA 03. Esquema metodológico do estudo da ação do extrato hidroalcoólico da casca da <i>A. colubrina</i> sobre a cinética fúngica	37
FIGURA 07. Avaliação da CIM do extrato hidroalcoólico da casca de <i>A. colubrina</i> frente às linhagens de <i>C. albicans</i> pela técnica de microdiluição	39
GRÁFICO 01. Cinética fúngica da cepa <i>C. albicans</i> ATCC 76485, frente ao extrato hidroalcoólico da casca da <i>A. colubrina</i>	41
FIGURA 08. Demonstração do efeito do extrato hidroalcoólico da casca da <i>A. colubrina</i> sobre a cinética fúngica	42

LISTA DE TABELAS

TABELA 01. Características farmacológicas dos principais derivados azólicos	23
TABELA 02. Caracterização fitoquímica do extrato hidroalcoólico da casca da <i>A. colubrina</i> .	38
TABELA 03. Avaliação da CIM o extrato hidroalcoólico da casca da <i>A. colubrina</i> frente às linhagens de <i>C. albicans</i> pela técnica de microdiluição	38
TABELA 04. Cinética fúngica da cepa <i>C. albicans</i> ATCC 76485, frente ao extrato hidroalcoólico da casca da <i>A. colubrina</i>	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACAM	Herbário Manuel de Arruda Câmara
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ATCC	American Type Culture Collection
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CT	Candida-toxina
FCR	Reagente Folin-Ciocalteu
LM	Laboratório de Micologia
MS	Ministério da Saúde
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNM	Política Nacional de Medicamentos
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
SDB	Sabouraud Dextrose Broth
SUS	Sistema Único de Saúde
TC	Taninos Condensados
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UV	Raios Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Geral	15
2.2 Específicos	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1 Candidíase	16
3.2 Agentes antifúngicos	18
3.2.1 Poliênicos	20
3.2.2 Derivados azólicos	21
3.3 Atividades biológicas das plantas medicinais	24
3.3.1 Metabólitos secundários e a atividade antimicrobiana	25
3.4 <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vellozo) Brenan	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Local da pesquisa	30
4.2 Obtenção do extrato hidroalcoólico de <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vellozo) Brenan.....	30
4.3 <i>Screening</i> fitoquímico	32
4.3.1 Determinação do teor de polifenóis totais	32
4.3.2 Determinação do teor de flavonoides	32
4.3.3 Determinação do teor de taninos condensados	33
4.4 Micro-organismo utilizado e inóculo	33
4.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	34
4.6 Estudo do efeito do extrato de <i>Anadenanthera colubrina</i> sobre a cinética fúngica ..	35
5 RESULTADOS	38
5.1 <i>Screening</i> fitoquímico	38
5.2 Atividade antifúngica e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) ..	38
5.3 Avaliação da cinética fúngica	40
6 DISCUSSÃO	43

7 CONCLUSÃO	46
8 PERSPECTIVAS	47
9 REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

Os fungos são seres dispersos no meio ambiente, em vegetais, ar atmosférico, solo e água e, embora estejam estimados em 250 mil espécies, menos de 150 foram descritos como patógeno aos seres humanos. Estão associados a três tipos de doenças humanas: as alérgicas, as tóxicas e as infecciosas (BRASIL, 2013).

Como relatado por Gompertz et al. (2004), os distúrbios alérgicos são causados pelas interações de um hospedeiro sensibilizado com antígenos fúngicos, imunologicamente reativos. As doenças tóxicas são provocadas pela ingestão de alimentos contaminados, tanto por fungos microscópicos produtores de toxinas quanto por fungos macroscópicos venenosos. As micoses, infecções causadas pelos fungos, são as mais representativas e de maior interesse clínico, uma vez que provocam desde infecções cutâneas superficiais até doenças mais graves e debilitantes.

Dentre as micoses destaca-se a candidíase, causada por espécies do gênero *Candida*. As espécies desse gênero são agentes oportunistas encontrados na microbiota da pele, apêndices cutâneos, mucosas do trato digestivo e geniturinário dos seres humanos, bem como em animais e no meio ambiente (GALVÁN; MARISCAL, 2006; DALAZEN et al., 2011). São mantidos em equilíbrio pela competição com as bactérias e pelos mecanismos de defesa do hospedeiro (SILVA; BORNSZTEIN, 1998). Quando esses mecanismos sofrem alterações e ofertam condições favoráveis, essas leveduras desenvolvem seu poder patogênico e invadem os tecidos.

Segundo Rang et al. (2007), desde os anos de 1970 tem havido uma incidência cada vez maior das infecções fúngicas sistêmicas sérias e um dos fatores responsáveis por isso foi o uso generalizado de antibióticos de amplo espectro, que eliminam ou diminuem a flora bacteriana normal que competem com os fungos.

A *Candida albicans* é a espécie mais investigada devido a elevada frequência de infecções oportunas causadas pelo seu alto poder invasivo, tanto em pacientes debilitados pelo tratamento com antibiótico e drogas imunossupressoras quanto no decorrer de doenças crônicas, como diabetes e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (GOMPERTZ et al., 2004). De modo que, essas enfermidades são importantes causas da morbi/mortalidade em todo o mundo, representando aproximadamente 30% das causas de mortes derivadas de infecções (NOGUEIRA, 2012).

Para o tratamento das infecções fúngicas causadas pelo gênero *Candida* estão disponíveis vários agentes antifúngicos, destacando-se dentre eles os poliênicos (representados pela anfotericina B e nistatina) e os azóis (fármacos fungistáticos sintéticos representados pelo fluconazol e cetoconazol), que são os fármacos eleitos para o tratamento inicial de infecção sistêmica (RANG et al., 2007).

Entretanto, o uso constante de antibiótico tem provocado uma série de problemas, dentre os quais, se destacam o desequilíbrio da ecologia humana e a resistência (MOELLERING JR, 2000; ANTUNES et al., 2006). Este problema é intensificado em países como o Brasil, onde a população tem por hábito a automedicação, utilizando de maneira indevida os antibióticos, sem informações corretas sobre dosagens e posologia (TRESOLDI et al., 2000). De modo que há uma necessidade cada vez maior de tentar elaborar fármacos antifúngicos modernos, principalmente, devido aos números crescentes de cepas resistentes aos agentes hoje disponíveis, aliado a alta toxicidade e baixa eficácia (RANG et al., 2007).

Nos últimos anos tem sido observado crescente interesse da comunidade científica pelas plantas medicinais e pela fitoterapia, isto ocorre, em parte, pelo alto potencial terapêutico e econômico, sendo usados especialmente pela indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novos produtos, com menos efeitos indesejáveis do que os já existentes (MARTÍNEZ GUERRA et al., 2000; BRANDÃO et al., 2006; LIMA et al., 2006; MEDEIROS et al., 2007; HENDRY et al., 2009). Além disso, é também um modelo ecologicamente correto de produção de substâncias que sejam eficazes e menos agressivas tanto para o meio ambiente como para o homem, contribuindo assim para uma melhor qualidade de vida (DEOUX; DEOUX, 1999; PALMEIRA et al., 2010).

Dentre as plantas utilizadas na medicina popular, destaca-se o uso e potencialidade da *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan, conhecida como angico.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Determinar o efeito antifúngico *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan sobre *Candida albicans*.

2.2 Específicos

- Caracterizar fitoquimicamente o extrato hidroalcoólico de *A. colubrina*;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* sobre cepas de *C. albicans*;
- Determinar a cinética fúngica (curva de morte) promovida pela ação do extrato hidroalcoólico de *A. colubrina* sobre cepas de *C. albicans*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Candidíase

A candidíase, também denominada de candidose, é uma infecção fúngica ocasionada por leveduras do gênero *Candida*. São reconhecidas cerca de 81 espécies (CASTRO, 2010) e oito delas apresentam interesse clínico pelo potencial para promover doenças. O agente de maior destaque é a *Candida albicans* (Figura 01), porém, diversas outras espécies têm sido também identificadas, destacando-se dentre elas: *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii* e *C. lusitanae* (GOMPERTZ et al., 2004).

A *C. albicans* é um patógeno oportunista que habita o corpo humano de forma comensal, tendo sido isolado na boca, no tubo digestivo, no intestino, na orofaringe, na vagina e na pele. Quando ocorre alterações no sistema imunológico e há desequilíbrio da microbiota endógena, passam da condição de comensal para patógenos com alto poder invasivo (PEREIRA et al., 2009) além disso, essa espécie é bastante virulenta e apresenta considerável plasticidade morfológica, o que lhe garante patogenicidade (MONGE et al., 2006).

FIGURA 01: *Candida albicans* em Sabouraud Dextrose Agar



Fonte: Autor, 2014

Dentre os principais fatores de virulência da *C. albicans*, destaca-se a habilidade em produzir enzimas hidrolíticas extracelulares, como as proteinases, que hidrolisam ligações peptídicas, e as fosfolipases, que hidrolisam os fosfoglicerídeos (CANDIDO; AZEVEDO; KOMESU, 2000). Entretanto, outros fatores como o dimorfismo (variação de antígenos da parede), adesinas, *switching* (variações fenotípicas) e toxinas citadas como a cândida-toxina (CT) tem sido relatados com frequência (GOMPERTZ et al., 2004).

Apesar da maioria dos casos está relacionada a um fator endógeno, a candidíase pode provir também de fontes exógenas, principalmente intra-hospitalar (LASS-FLORL, 2009).

Clinicamente, a doença pode surgir como manifestações em mucosas (oral, vaginal e esofágica) até quadros sistêmicos com a invasão de diversos órgãos, como ocorrem em pacientes imunodeprimidos (SIDRIM, MOREIRA, 1999). As manifestações podem ser classificadas em: mucocutânea, cutânea e sistêmica. (MENEZES et al., 2004)

A candidíase mucocutânea acomete a cavidade oral e o canal vaginal constituindo a forma mais disseminada entre os seres humanos. Vários fatores endógenos estão ligados incluem ao desenvolvimento da candidíase destacando-se: alterações na microbiota normal após uso prolongado de antibióticos; o baixo pH das secreções salivares dos recém nascidos, hipertrofia das papilas da língua e glossite crônica (MENEZES et al., 2004; RODRIGUES et al., 2011), além de disfunções genéticas nas funções dos leucócitos e do sistema endócrino (GONZÁLEZA; CANALESA; MORALESB, 2010).

A candidíase cutânea é comumente crônica, sendo observada em pacientes com deficiências nutricionais e com o sistema imune suprimido. Apresenta-se, geralmente, com lesões eritematosas, crostosas e com exsudatos (GOMPERTZ et al., 2004), podendo acometer várias áreas úmidas do corpo, como espaços interdigitais, região das mamas, axilas, pregas das virilhas e regiões debaixo das unhas (MENEZES et al., 2004; GONZÁLEZA et al., 2010).

A candidíase sistêmica é bastante grave e de difícil diagnóstico, devido ao polimorfismo das lesões, variabilidade dos sinais e sintomas e dificuldade em isolar o micro-organismo no sangue (GOMPERTZ et al., 2004). Ocorre em pacientes terminais com doenças debilitantes, neoplásicas, imunodeprimidas e após transplantes de órgãos (GROSSI, 2009; COUTO et al., 2011). Nesses casos, os micro-organismos podem ser isolados em vários órgãos, destacando-se: rins, cérebro, coração, trato digestivo, brônquios, pulmões e sangue.

Endocardites por *Candida* podem ocorrer em pacientes com defeitos vasculares, viciados em drogas, em pacientes imunodeprimidos (GOMPertz et al., 2004) com valvopatia e que fazem uso de cateteres, causando episódios de septicemia (FARIDI et al., 2007). Também se caracteriza como uma das principais causas de morbi/mortalidade por ser responsável pela sepse em recém nascidos (PAULA et al., 2006; BORGES et al., 2009; LUCIGNANO et al., 2011).

Em alguns casos, a candidose pode causar cegueira, meningite, abscessos cerebrais e renais que levam a um comprometimento neurológico grave e uma insuficiência renal, respectivamente (BENJAMIN et al., 2003).

3.2 Agentes antifúngicos

Os fungos são mais complexos do que as bactérias ou vírus no que se refere a sua morfologia (FARIAS; LIMA, 2000; SOUZA et al., 2004; MARTINS, 2009). Além de possuírem componentes na parede celular, são detentores de diferentes ribossomos e uma discreta membrana nuclear. Assim, os antibacterianos não são eficazes contra fungos patogênicos (WISPELWEY; PARSONS, 2006).

O tratamento de infecções fúngicas ainda é dificultado por problemas de solubilidade, estabilidade e absorção dos agentes terapêuticos existentes (MIMS et al., 2005; CATÃO, 2007), soma-se a essa dificuldade, o reduzido número de fármacos adequados para o tratamento quando comparados às substâncias antibacterianas (COWEN; STEINBACH, 2008). Geralmente, os antifúngicos são considerados tóxicos e muitos não apresentam uma toxicidade seletiva, como é o caso dos inibidores da atividade dos ribossomos que também são ativos contra os ribossomos humanos. Isso deve-se ao fato da semelhança existente entre as células fúngicas e as células dos humanos (COWEN; STEINBACH, 2008).

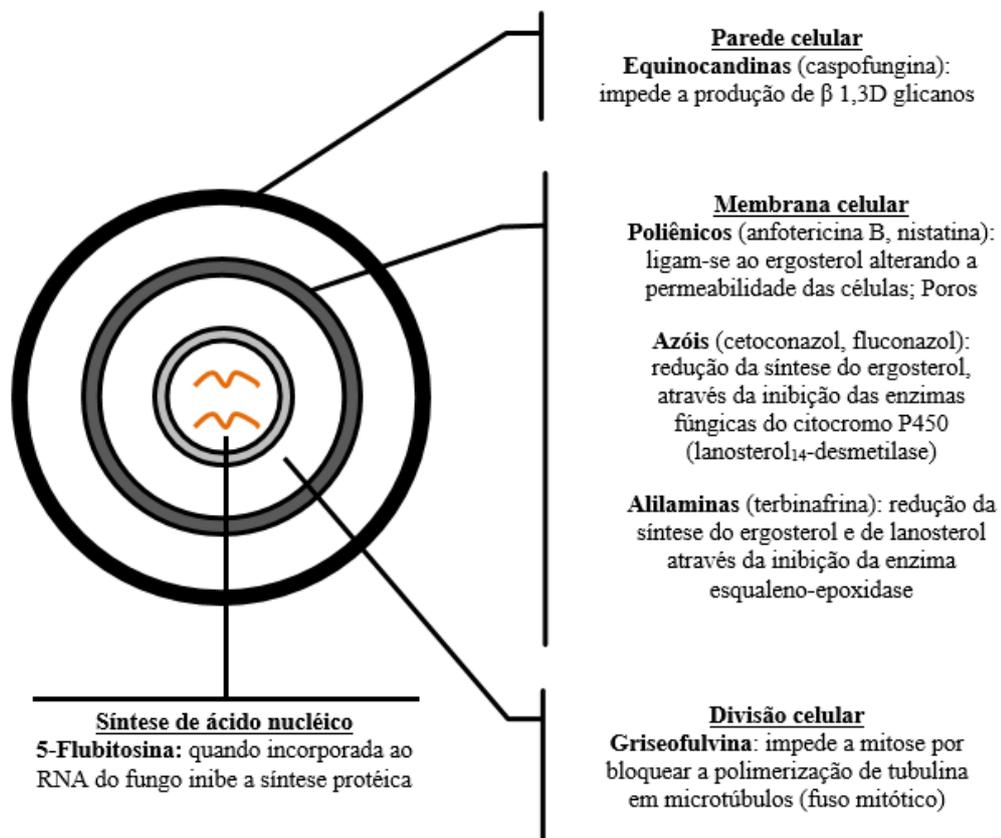
Pela variabilidade dos sintomas demonstrados, a abordagem medicamentosa para tratamento da candidíase incluiu agentes tópicos e sistêmicos (WANNMACHER; FERREIRAS, 2007), os quais devem ser utilizados pós análise do quadro clínico e do estado geral do paciente (ALVES, et al., 2006).

As duas principais classes de antifúngicos usados, atualmente, no tratamento de infecções causadas por *Candida* são: poliênicos (anfotericina B e nistatina) e os derivados azólicos que, de acordo com o número de átomos de nitrogênio no anel azólico, podem ser

classificados em imidazóis (miconazol e cetoconazol) e triazóis (fluconazol e itraconazol) (PAIVA, et al., 2009). Pela relativa atoxicidade, amplo espectro de ação, boa biodisponibilidade oral e baixo custo a última classe são os eleitos para o tratamento inicial (BENNETT, 2005).

A figura 02 apresenta de forma simplificada os locais e mecanismos de ação dos principais antifúngicos, segundo Wispelway e Parsons (2006).

FIGURA 02: Locais e mecanismos de ação das drogas antifúngicas



Fonte: Adaptado (WISPELWEY; PARSONS, 2006).

O uso constante de antibióticos tem provocado uma série de problemas, dentre os quais, se destacam o desequilíbrio da ecologia humana e a resistência (MOELLERING JR, 2000; ANTUNES et al., 2006). Há uma necessidade cada vez maior de fármacos antifúngicos modernos, devido principalmente, aos números crescentes de cepas resistentes aos agentes hoje disponíveis (RANG et al., 2007). A eficácia limitada dos antifúngicos disponíveis está ligada ao rápido desenvolvimento de micro-organismos resistentes, diminuindo a capacidade terapêutica desses agentes (SVETAZ, et al., 2007).

A diminuição da suscetibilidade e aumento da resistência aos antifúngicos pode ser explicada de várias formas, entretanto, destacam-se: baixo nível do fármaco no tecido e no sangue, ou seja, aos fatores farmacocinéticos das drogas; a possível interação entre fármacos, problema comum na politerapia antimicrobiana e imunodepressão do paciente (SHAPIRO et al., 2011). Para Silva, Díaz e Febré (2002) os fatores relacionados aos hospedeiros são considerados como os mais importantes para o surgimento da resistência aos antifúngicos.

As leveduras do gênero *Candida* desenvolvem diversos mecanismos de resistência, destacando-se as mutações pontuais ligadas os genes do ergosterol, que provocam alterações conformacionais provocando diminuição na ligação dos azóis ao alvo (RIBEIRO; PAULA, 2007; MANOHARLAL et al., 2008; SELMECKI et al. 2008, MARIE; WHITE, 2009). A resistência fúngica pode também resultar de alterações nas enzimas envolvidas na biossíntese do ergosterol, alterações cromossômicas, modificação ou degradação do fármaco e regulares transcricionais (CHEN et al., 2004; MANOHARLAL et al., 2008).

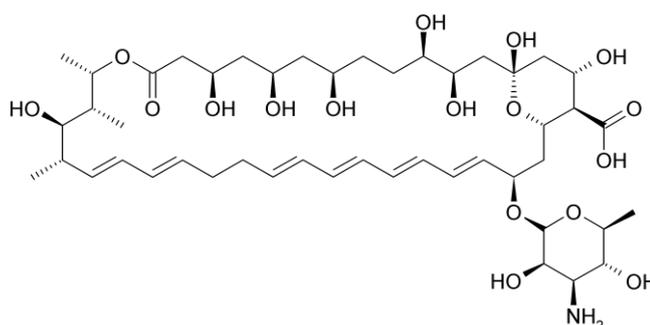
3.2.1 Poliênicos

Os antibióticos poliênicos são lactonas macrocíclicas que contêm uma porção hidroxilada hidrofílica e uma porção hidrofóbica conjugada por dupla ligação. Essas drogas agem alterando a permeabilidade das células por se ligarem aos esteróis (ergosterol) na membrana celular, formando poros que permitem o extravasamento de K^+ , Mg^{2+} e macromoléculas intracelulares (WISPELWEY; PARSONS, 2006). Apesar da sua maior afinidade para o ergosterol, não é descartada a possibilidade dos poliênicos interagirem com o colesterol da membrana celular humana, causando efeitos colaterais (ZOTCHEV, 2003; SHAPIRO et al., 2011).

As anfotericinas A e B são antibióticos antifúngicos produzidos pelo *Streptomyces nodosus*, entretanto, apenas a anfotericina B tem aplicação clínica. Apesar do seu uso ser limitado devido a sua elevada toxicidade, especialmente nefrotoxicidade, continua sendo a primeira escolha para tratar infecções fúngicas graves causadas principalmente por *C. albicans* e por *Cryptococcus neoformans*, além de também ser utilizada para tratar a maioria das infecções endêmicas causadas por *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* e *Coccidioides immitis* (SILVA, 2006).

A nistatina é uma substância extraída de culturas de *Struptyomyces* e foi descoberta em 1950, sendo desde então é usada na terapêutica antifúngica. Entretanto, pode ser demasiadamente toxica para o uso parenteral, só é usada topicamente para tratar infecções de pele e mucosas causadas por *Candida*, sendo comprovadamente eficaz para candidíase oral, vaginal e esofagite. Praticamente não é absorvida nestas áreas, apresentando, portanto, pouca toxicidade (SILVA, 2006).

FIGURA 03: Estrutura química da Anfotericina B



Fonte: <<http://goo.gl/pKRTxD>>

3.2.2 Derivados azólicos

Os derivados azólicos constituem um grupo de antifúngicos sintéticos, com amplo espectro de atividade e caracterizados pela presença de um anel azólico ligados por ligação carbono-nitrogênio com outros anéis aromáticos. A função destes anéis é de modificar as propriedades físico-químicas, aumentar a eficácia terapêutica e reduzir a toxicidade (TERRELL, 1999; HERBRECHET, 2004).

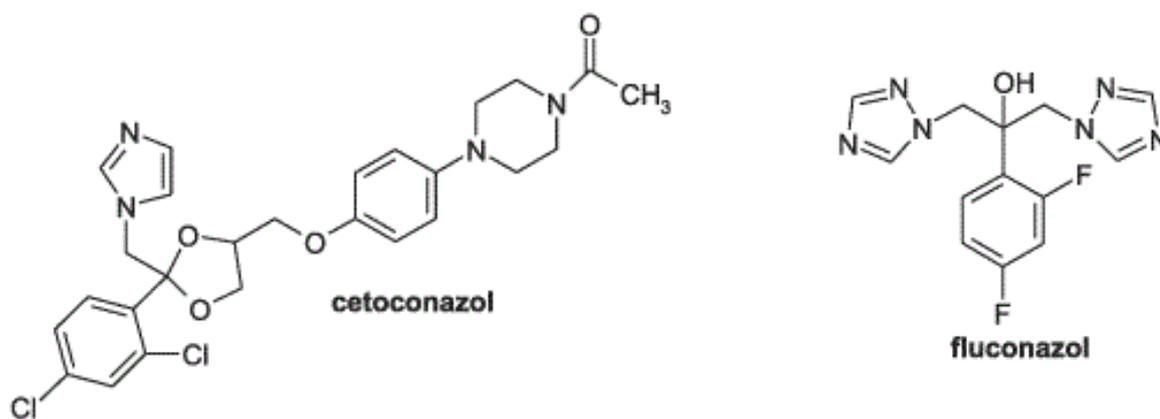
Dependendo da concentração da droga, os azóis podem apresentar efeitos fungistáticos ou fungicidas e podem ser classificados em imidazóis ou triazóis, de acordo com o número de átomos de nitrogênio no anel azólico. Quando há apenas um átomo de nitrogênio é imidazól (miconazol, cetoconazol) e quando há três átomos de nitrogênio no anel é triazól (fluconazol, itraconazol) (CATALÁN; MONTEJO, 2006), exemplos são apresentados na figura 04.

Em fungos crescendo ativamente, os azóis inibem a síntese da membrana celular dos fungos, inibindo a incorporação ou a síntese de ergosterol. Esses agentes interagem com a esterase 14- α -demetilase, um sistema de enzimas microsômicas dependentes do citocromo P450, e, então, o ergosterol não é produzido comprometendo a fluidez da membrana. Quando presente em altas concentrações, os azóis podem causar o vazamento de K^+ e outros

componentes intracelular, uma ação que parece estar envolvida com a inibição da ATPase da membrana plasmática. Como esses agentes também inibem a respiração fúngica sob condições aeróbicas, um mecanismo alternativo pode ser o bloqueio do transporte de elétrons da cadeia respiratória (WISPELWEY; PARSONS, 2006).

A especificidade das drogas azólicas resulta da sua maior afinidade pelas enzimas fúngicas do citocromo P450 do que pelas enzimas humanas do citocromo P450 (SILVA, 2006). No entanto, pode ocorrer inibição do citocromo P450 humano resultando em redução da absorção do fármaco e o surgimento de efeitos adversos (WAKIEC et al., 2007; LEWIS, 2011).

FIGURA 04: Estrutura química do Cetoconazol e Fluconazol



Fonte: <<http://goo.gl/Jff2PH>>

Os triazólicos sistêmicos são metabolizados mais lentamente e exercem menos efeitos sobre a síntese de esteróis humanos do que os imidazólicos. O cetoconazol é um imidazól administrado por via oral e que foi substituído pelo itraconazol, um triazól, no tratamento de todas as micoses, exceto quando o menor custo do cetoconazol supera as vantagens do itraconazol. O itraconazol não apresenta a hepatotoxicidade e a supressão dos corticosteroides produzidas pelo cetoconazol mas é capaz de manter a maioria das propriedades farmacológicas do cetoconazol com expansão do espectro antifúngico. Além disso, o cetoconazol necessita de um ambiente ácido para a dissolução, assim sua biodisponibilidade é acentuadamente deprimida em pacientes que estão em uso de agentes bloqueadores dos receptores de histamina H₂ (cimetidina, por exemplo), antiácidos e fármacos tampão (como o agente anti-HIV didanosina). O tempo de meia-vida aumenta com a dose e pode atingir 7-10 horas quando se administra uma dose de 800 mg (BENNETT, 2005).

O itraconazol é metabolizado pelas enzimas do citocromo P450 e, assim como a hidroxitraconazol, seu metabólito biologicamente ativo, tem uma intensa ligação com as proteínas plasmáticas o que promove um longo tempo de meia-vida (BENNETT, 2005).

O fluconazol, outro triazol, é quase completamente absorvido pelo trato gastrintestinal e sua biodisponibilidade não é alterada pela presença de alimento nem pela acidez gástrica (BENNETT, 2005).

TABELA 01: Características farmacológicas dos principais derivados azólicos

	Cetoconazol	Itraconazol	Fluconazol
Hidrossolubilidade	Fraca	Fraca	Boa
T ½ (h)¹	7-10	25-42	25-30
Espectro antifúngico <i>in vitro</i>			
<i>Candida albicans</i>	+++	++++	+++
<i>Candida krusei</i>	+++	++++	0
<i>Candida glabrata</i>	+++	+++	+
<i>Candida tropicalis</i>	+++	++++	+++
<i>Cryptococcus neoformans</i>	+++	++++	+++
<i>Aspergillus spp.</i>	+	++++	0
<i>Histoplasma capsulatum</i>	+++	++++	+++

Legenda: ¹Tempo de meia-vida (h); 0 – inativo *in vitro*; ++++ muito ativo *in vitro*.

Fonte: Adaptado (SILVA, 2006).

O cetoconazol foi o primeiro derivado azólico oral usado em clínica. Diferencia-se dos triazóis por uma baixa seletividade para as enzimas do citocromo P450 fúngico, o que acaba por influenciar as enzimas do citocromo P450 humano. Assim, a administração sistêmica é perigosa indicando seu uso tópico para as infecções dermatológicas (SILVA, 2006).

O fluconazol é muito hidrossolúvel e capaz de penetrar no líquido. As interações são mais raras devido à baixa indução enzimática mitocondrial provida pelo agente. Por causa desse

efeito e melhor tolerância gastrointestinal, o fluconazol apresenta o maior índice terapêutico entre os derivados azólicos, configurando-o como o azol de escolha no tratamento e profilaxia de muitas infecções fúngicas (SILVA, 2006).

3.3 Atividades biológicas das plantas medicinais

A flora medicinal tem sido o alicerce dos cuidados da saúde em todo o mundo desde os primórdios da humanidade. Ela constitui um vasto arsenal terapêutico já há vários anos, sendo empregadas tanto em preparações tradicionais (chás, sucos, xaropes, cataplasmas, tinturas, unguentos) quanto na forma de princípios ativos puros. As plantas são importantes ferramentas para a investigação farmacológica e desenvolvimento de fármacos, atuando como fitocompostos bioativos e sendo utilizados diretamente como agentes terapêuticos farmacologicamente ativos (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003).

O reconhecimento de seu valor terapêutico e econômico continua a crescer, principalmente em países em desenvolvimento. Diversos pesquisadores preconizam a necessidade de fomentar políticas de identificação e caracterização de plantas medicinais, ou de seus extratos, para que elas possam formar parte de listas nacionais de medicamentos e inclusive substituir alguns produtos farmacêuticos importados (CORRÊA; BATISTA; QUINTAS, 2008).

O enorme interesse da comunidade científica pelo desenvolvimento das pesquisas tendo a flora medicinal como principal objeto de estudo, advém, sobretudo, do elevado custo dos compostos sintéticos fabricados pelas indústrias. A própria confiança e aceitação do paciente favorece a expansão do uso da terapia medicinal. Segundo Blumentahl (1998), na Alemanha, país que consome metade dos extratos vegetais comercializados em toda a Europa, a automedicação com plantas é a terapia alternativa mais disseminada e utilizada pela população.

O Brasil, país como vasta biodiversidade, conta com um número estimado de mais de 20% do número total de espécies do planeta, com número superior a 55 mil já catalogadas, sendo 8% destas estudadas para identificação de moléculas bioativas e 4 mil reconhecidas como plantas medicinais (BRASIL, 2004; CATÃO et al., 2010). Atrelando a essa diversidade na flora, o conhecimento popular aproxima o uso das plantas medicinais aos recursos terapêuticos disponíveis, o que acaba por motivar a utilização da prática pelo poder público (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006).

Em 2006, o Ministério da Saúde (MS), através da Portaria nº 971, aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2006). Em seguida, após a aprovação da PNPIC, o MS lançou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), visando garantir à população brasileira o acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2007).

É importante ressaltar que as substâncias naturais, mesmo as consideradas terapêuticas, também podem causar efeitos indesejados ou tóxicos. Agra et al. (2007) relatam o risco de toxicidade de fitoterápicos e de seu uso indiscriminado pela população leiga.

A utilização ponderada e racional das plantas medicinais, seja como suporte para desenvolvimento de novos fármacos seja como terapia de fato, é simples, barata e bastante eficaz para promover os cuidados da saúde. Esses três fatores são, certamente, prioridade em qualquer sistema de saúde ao redor do mundo. Sendo assim, as plantas têm extrema importância no contexto terapêutico mundial, mais especialmente em países em desenvolvimento, como o Brasil (CORRÊA; BATISTA; QUINTAS, 2008).

3.3.1 Metabólitos secundários e a atividade antimicrobiana

Ao conjunto de reações químicas que acontecem nas células dá-se o nome de metabolismo. Os compostos químicos formados/degradados nas rotas metabólicas, garantidas pela especificidade enzimática, são chamados de metabólitos. Essas reações visam, primariamente, ao aproveitamento de nutrientes para satisfazer as exigências fundamentais da célula: energia (ATP), agentes redutores (NADPH) e a biossíntese das substâncias essenciais à sobrevivência (carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos). Por serem considerados processos essenciais à vida têm sido definidos de metabolismo primário (SANTOS, 2007).

Entretanto, vegetais, micro-organismos e, em alguns casos, animais, são capazes de produzir, transformar e acumular inúmeras outras substâncias não necessariamente relacionadas à manutenção da vida. Isso deve-se ao vasto arsenal metabólico que esses seres apresentam (enzimas, coenzimas e organelas). Esse grupo de substâncias se caracterizam como elementos de diferenciação e especialização e são oriundas do metabolismo secundário (SANTOS, 2007).

Os metabólitos secundários, por muito tempo, foram considerados produtos de excreção do vegetal, atualmente, entretanto, sabe-se que muitas destas substâncias estão envolvidas nos mecanismos adaptativos desses seres (SANTOS, 2007). Já foram reconhecidas a defesa contra herbívoros e micro-organismos, a proteção contra os raios ultravioleta (UV), a atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes (WINK, 1990).

As rotas metabólicas dos metabólitos secundários talvez só sejam ativadas durante alguns estágios particulares: crescimento, desenvolvimento ou quando o vegetal depara-se com períodos de estresse causado, sobretudo, por limitações nutricionais ou ataque microbiológico (MANN, 1987).

Entre os metabólitos secundários destacam-se, por sua ação antimicrobiana, os fenóis, terpenos, alcaloides, lecitinas, polipeptídios, poliácetilenos, poliaminas, isotiocianatos, tiossulfatos e glucosídeos (NOGUEIRA, 2000). Os vegetais ricos em taninos, flavonoides, óleos essenciais e polifenóis estão entre os mais avaliados para esta atividade (COUTINHO et al., 2008).

Segundo Estevam (2006), os compostos isolados das plantas naturais são capazes de atuar no metabolismo intermediário, ativando enzimas ao nível nuclear ou ribossomal com consequência direta nas membranas e no metabolismo do micro-organismo. Assim, a pesquisa para obtenção de substâncias com atividade antimicrobianas derivadas dos vegetais, e que tenham efeitos adversos menos graves, são frutos constantes da pesquisa científica (BRESOLIN; FILHO, 2003).

3.4 *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan

De acordo com o Sistema de Classificação de Cronquist, a taxonomia da *Anadenanthera* (antera sem glândula) *colubrina* (do latim colubra em alusão a cobra); obedece a seguinte hierarquia: I) Divisão: Magnoliophyta (Angiosperma); II) Classe: Magnoliopsida (Dicotyledonae); III) Ordem: Fabales; IV): Família: Fabaceae; V) Subfamília: Momosaceae; VI) Gênero: *Anadenanthera*; VII) Espécie: *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan. Tem como sinonímia botânica: *Acacia colubrina* Martius, *Anadenanthera colubrine* (Vellozo) Brenan, *Mimosa colubrina* Vellozo e *Piptadenia colubrina* (Vellozo) Bentham (CARVALHO, 2002). A proposta de Brenan, em 1955, consistia em quatro espécies, todas incluídas anteriormente no gênero *Piptadenia* devido as semelhanças morfológicas (CARVALHO, 1994;

PESSOA, 2008). É conhecido popularmente como: angico, angico-branco, angico-preto, angico-vermelho, angico de casca, arapiraca e cambuí-angico (LORENZI, 1998).

O angico (Figura 05) é uma espécie nativa das florestas tropicais da América do Sul, está amplamente distribuída na região norte da Colômbia e geograficamente bem distribuída por todo território brasileiro, ocorrendo desde o Maranhão até o Paraná (DELGOBO et al., 1998). Facilmente adaptável as condições ambientais, apresenta expressiva regeneração natural (RODRIGUES et al., 2007; GONÇALVES et al., 2008).

FIGURA 05: Árvore de *Anadenanthera colubina* (Vellozo) Brenan



Fonte: "Anadenanthera colubrina tree" by João Medeiros. <<http://goo.gl/c3a3NJ>>

Árvore de grande porte, apresenta caule tortuoso e mediano. Sua casca, principal material utilizado na medicina popular, varia de uma forma lisa e clara até uma forma rugosa e fissurada com coloração variando entre o marrom claro a preto (BRAGA, 2001; LORENZI; MATOS, 2002). Seus ramos mais novos apresentam-se espinhosos. É uma planta característica de florestas secundárias em terrenos arenosos, ocorrendo em terrenos altos e bem drenados (LORENZI; MATOS, 2002).

A utilização do angico por tribos indígenas, principalmente pelos índios Tupi-Guarani e Tupari da América do Sul, em cerimônias místico-religiosas despertou o interesse científico para sua potencialidade biológica (TORRES; REPKE, 2006).

Sua madeira é intensamente aproveitada, sendo indicada para tacos, marcenaria, obras internas, ripas, embalagens e na construção civil e naval (CARVALHO, 2002). Entretanto, apesar de ter madeira resistente seu uso, por vezes, é limitado devido ao tempo que leva para secar, chegando a brotar durante o processo (FERRETTI et al., 1995). As folhas murchas são tóxicas ao gado, porém, fenadas ou secas, constituem boa forragem (CARVALHO, 2002).

Segundo Pirani & Cortopassi-Laurino (1993) e Barros (1960), o angico é uma planta melífera, que fornece pólen e néctar com até 33% de açúcar, apresentando mel com qualidade superior. É espécie recomendada por Durigan e Nogueira (1990) para recuperação de terrenos depauperados e erodidos, bem drenados, e para reposição de mata ciliar em terrenos com inundação. Para Ferretti e colaboradores (1995), por ser uma árvore robusta, fornece lenha e carvão de ótima qualidade e grande quantidade, um exemplar chega a fornecer mais de 5m³ de lenha.

Na medicina popular, o angico é utilizado em preparações de xaropes no tratamento das afecções pulmonares e das vias respiratórias, coqueluche, bronquites, faringites e asma. Quando preparada com álcool ou cachaça, é aplicada em ferimentos externos, agindo como cicatrizante (MATOS, 1997; PALMEIRA et al., 2010). A casca, de sabor amargo, apresenta propriedade adstringente, depurativa, hemostática, além de ser útil nas doenças sexuais, com ação sobre as fibras do útero (LOPES, 1986; RODRIGUES, 1996; CARVALHO, 2002). Mediante fermento do tronco, produz abundante goma-resina ideal para tratamento infeccioso de pele (MORS et al., 2000).

Por ter uma complexa composição química, constituída por vários metabólitos secundários, apresenta-se como rica fonte de pesquisas para diversos estudos que já elucidaram diferentes potenciais terapêuticos como a atividade antiproliferativa (LIMA et al., 2014); atividade imunológica (MORETÃO et al., 2003), anti-inflamatória (ALBUQUERQUE; OLIVEIRA, 2007; ARAÚJO et al., 2008); antibacteriana (PALMEIRA et al., 2010) e antifúngica (WEBER, 2010; LIMA et al., 2014). As espécies desse gênero são conhecidas por demonstrarem elevadas concentrações de taninos em sua entrecasca (SIQUEIRA et al., 2012).

Nas sementes foi encontrado o alcaloide bufotenina, correlacionando o uso alucinógenos pelos índios sul-americanos (PACHTER; ZACHARIAS; RIBEIRO, 1959). E na casca, também foram identificados, esteróides (β -sitosterol) e triterpenóides (lupenona e lupeol) (GUTIERREAZ-LUGO et al., 2004). O β -sitosterol apresenta um leque de atividades biológicas, todas comprovadas mediante estudos, dentre elas, antibacteriana (BELTRAME et

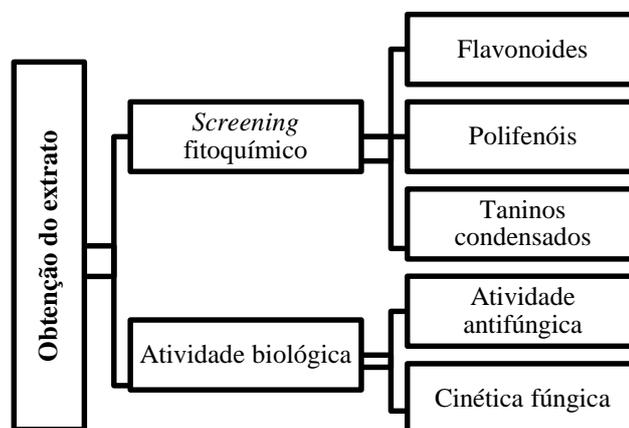
al., 2002), antifúngica (KIPRONOEL et al., 2000) e anticâncer, especificamente contra neoplasias das mamas (AWAD; BURR; FINK, 2005) e de colo (AWAD et al., 1998).

A atividade antimicrobiana da planta é, provavelmente, devido à grande presença de flavonoides e taninos em suas folhas e casca. Onde os flavonoides complexam-se com a parede celular provocando sua ruptura (SOUSA et al., 1991; TSUCHIY et al., 1996; GONÇALVES, 2007).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento da pesquisa coletou-se, inicialmente, o material vegetal. Com as cascas foi obtido o extrato hidroalcoólico, utilizado tanto para o *screening* fitoquímico, onde determinou-se o teor de flavonoides, polifenóis totais e taninos condensados, quanto para a pesquisa da atividade biológica, que procurou confirmar a atividade antifúngica e desenvolver a cinética fúngica. O fluxograma 01 abaixo apresenta de forma resumida o esquema metodológico empregado durante a execução das atividades propostas para este trabalho.

FLUXOGRAMA 01: Esquema metodológico para o desenvolvimento da pesquisa



4.1 Local da pesquisa

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Pesquisa de Atividade Antimicrobiana, Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus I, no município de Campina Grande/Paraíba.

4.2 Obtenção do extrato hidroalcoólico de *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan

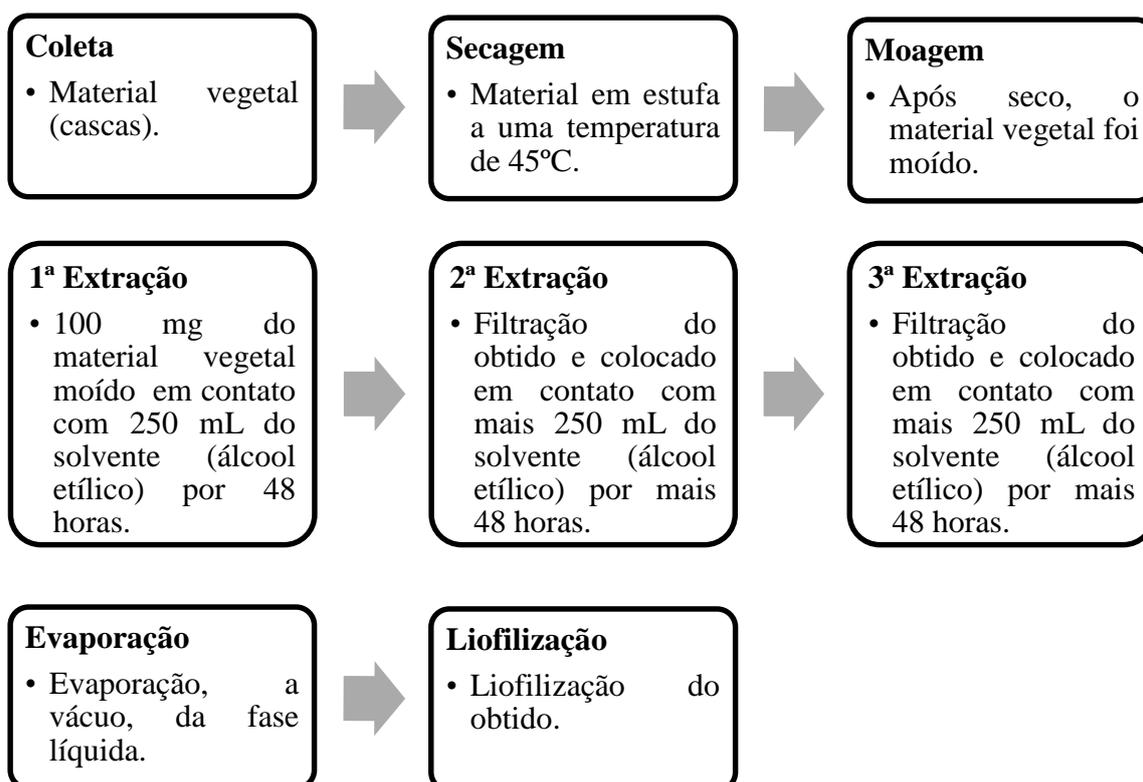
O material vegetal foi coletado na região do semiárido, Serra de Bodocongó, município de Queimadas do estado da Paraíba, Brasil (7° 22' 25" S, 35° 59' 32" W). O espécime testemunho da *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan, encontra-se arquivado na coleção

do Herbário Manuel de Arruda Câmara (ACAM) da Universidade Estadual da Paraíba, Campus I, Campina Grande-PB sob o registro nº 667/ACAM.

Conforme metodologia proposta por Carvalho et al. (2011), o extrato hidroalcoólico a 80% foi obtido da casca da planta, através do processo de percolação. A percolação é um processo dinâmico onde se faz o arrastamento do princípio ativo pela passagem contínua do líquido extrator, levando ao esgotamento da planta através do gotejamento lento do material. A percolação é indicada para processo extrativos de substâncias farmacologicamente ativas, devido, principalmente, pela vantagem de que não há riscos de degradação de compostos sensíveis (NAVARRO, 2005).

Após a coleta, a casca foi levada a estufa a uma temperatura de 45°C para secagem, sendo, posteriormente, moído. Foram, então, colocadas 100 mg das cascas moídas em contato com 250 mL de solvente, álcool etílico, por um período de 48 horas. O obtido foi filtrado e a extração foi repetida mais duas vezes. A fase líquida foi, então, evaporada a vácuo e o obtido liofilizado na concentração de 100 mg/250 mL.

FLUXOGRAMA 02: Esquema metodológico para obtenção do extrato hidroalcoólico da casca da *A. colubrina*



4.3 Screening fitoquímico

O *screening* fitoquímico é a identificação presumível dos metabólitos constituintes do material vegetal. Para a determinação do teor de polifenóis totais e de flavonoides seguiu-se o princípio do ensaio com reagente Folin-Ciocalteu (FCR). Esse ensaio foi desenvolvido, inicialmente, por Singleton e colaboradores em 1965 e em 1999 houve sua delimitação e padronização para quantificação de fenóis totais (SINGLETON et al., 1999). O FCR é atualmente utilizado para mensurar a capacidade antioxidante de uma amostra e, assim, quantificar os metabólitos com essa ação. O sistema caracteriza-se por uma mistura de ácidos fosfotungstíco e fosfomolibídico (coloração amarelada) em um meio básico. Os fenóis contidos nas amostras são energeticamente oxidados em meio básico, resultando na formação do O_2^- , o qual reage com os ácidos formando compostos (coloração verde) (TOMEI; SALVADOR, 2007).

4.3.1 Determinação do teor de polifenóis totais

Foi utilizada a metodologia proposta por Chandra e Mejía (2004). Nas análises, realizadas em triplicatas, adicionou-se 1 mL da solução aquosa do extrato em 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 1N. A mistura ficou em repouso durante 2 minutos sendo, posteriormente, adicionada à 2 mL de uma solução aquosa de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 20% e deixada em repouso por mais 10 minutos. Após este período foi realizada a leitura da absorbância a 757nm 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 $\mu g/mL$. Os polifenóis determinados por FCR são, frequentemente, expressos em ácido gálico equivalente. Na análise em questão obteve-se o resultado em miligramas equivalentes de ácido gálico.

4.3.2 Determinação do teor de flavonoides

Seguiu a metodologia colorimétrica de Folin-Ciocalteu descrita por Meda et al. (2005). Foram adicionados, em iguais proporções (5 mL), o extrato e uma solução de cloreto de alumínio ($AlCl_3$) a 2%, ambos em metanol. Transcorridos 10 minutos, realizou-se a leitura da

absorbância a 415nm em espectrofotômetro (Shimadzu® UV Mini – 1240), 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 triplicatas.

4.3.3 Determinação do teor de taninos condensados

Para determinar o teor de taninos condensados (TC), foi utilizado o método do reagente de vanilina. Para esse método a quantificação envolve uma reação do aldeído aromático, a vanilina, com um anel metassubstituído dos flavonoides (HAGERMAN; BUTLER, 1989). Apesar do reagente de vanilina detectar tanto flavonoides monoméricos quanto poliméricos, ele apresenta uma grande especificidade para uma classe limitada de compostos que apresentam ligação simples na posição 2,3 e grupos hidroxila em posições alternadas no anel A. As catequinas (leucoantocianidinas) e os taninos (proantocianidinas) reagem com a vanilina na presença de ácido clorídrico (HCl) para produzir um condensado vermelho (DESHPANDE; CHERYAN; SALUNKHE, 1986). A catequina comercial foi empregada como padrão.

A quantificação do teor de taninos condensados seguiu a metodologia de Makkar e Becker (1993), onde 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 foi realizada em tubos de ensaio mergulhados em água com temperatura controlada (20°C). A leitura foi realizada a 500nm em espectrofotômetro (Shimadzu® UV Mini – 1240), 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 a 100 $\mu\text{g/mL}$. A concentração de TC foi expressa em miligramas equivalentes de catequina. As análises também foram realizadas em triplicata.

4.4 Micro-organismos utilizados e inóculo

Para a realização do estudo da atividade biológica foram utilizadas cepas de *Candida albicans* de referência do American Type Culture Collection ATCC® 76485™ e sete cepas

ambulatoriais de *Candida albicans* sensíveis ao fluconazol, identificadas como: LM 11; LM 94; LM15; LM 520; LM 14; LM 70; LM 17, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Os isolados foram mantidos estocados em Sabouraud Dextrose Agar (Acumedia®) sob refrigeração. Para preparação do inóculo foram selecionadas colônias isoladas de cultura jovem (24 – 48 horas) e com auxílio de uma alça de transferência imergidas em 5 mL de solução salina (NaCl a 0,85%). A turvação do inóculo foi comparada visualmente ao tubo 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL).

4.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A sensibilidade dos micro-organismos aos agentes antimicrobianos é representada pela Concentração Inibitória Mínima (CIM). Esse índice corresponde a menor concentração do agente capaz de inibir o desenvolvimento visível do micro-organismo.

A CIM do extrato de *A. colubrina* frente às cepas ensaiadas foi determinada pela técnica de microdiluição em placa (NCCLS, 2004). Foram utilizadas microplacas estéreis de 96 cavidades de fundo redondo e tampa da marca MACROPLATE FLAT, nas quais foram distribuídos, assepticamente, 100 µL de Sabouraud Dextrose Broth (Acumedia®). Nas cavidades da coluna 1 adicionou-se 100 µL do extrato hidroalcoólico do angico na concentração de 16 mg/mL, previamente preparado utilizando o álcool etílico a 40% (40/60) como solvente, que, ao ser dispensado no poço, foi diluído ao valor de 8 mg/mL. Em seguida foram realizadas diluições seriadas, transferindo-se 100 µL das cavidades da coluna 1 até as da coluna 10 da placa. Após as diluições, adicionou-se 10 µL do inóculo fúngico nas cavidades, sendo: cepa ATCC 76485 (linha A); LM 11 (linha B); LM 94 (linha C); LM 15 (linha D); LM 520 (linha E); LM 14 (linha F); LM 70 (linha G); LM 17 (linha H).

A coluna 11 foi utilizada como controle positivo do crescimento microbiano (viabilidade da cepa estudada) com ausência da substância inibitória. A coluna 12 foi utilizada como controle negativo para comprovação da esterilidade do caldo utilizado (ausência de inóculo). Como controle padrão foi utilizado o fluconazol (adquirido em farmácia de manipulação) com concentração inicial de 240 µg seguindo o protocolo M21 (CLSI, 2008). As placas foram tampadas, seladas e incubadas por 37°C/48h.

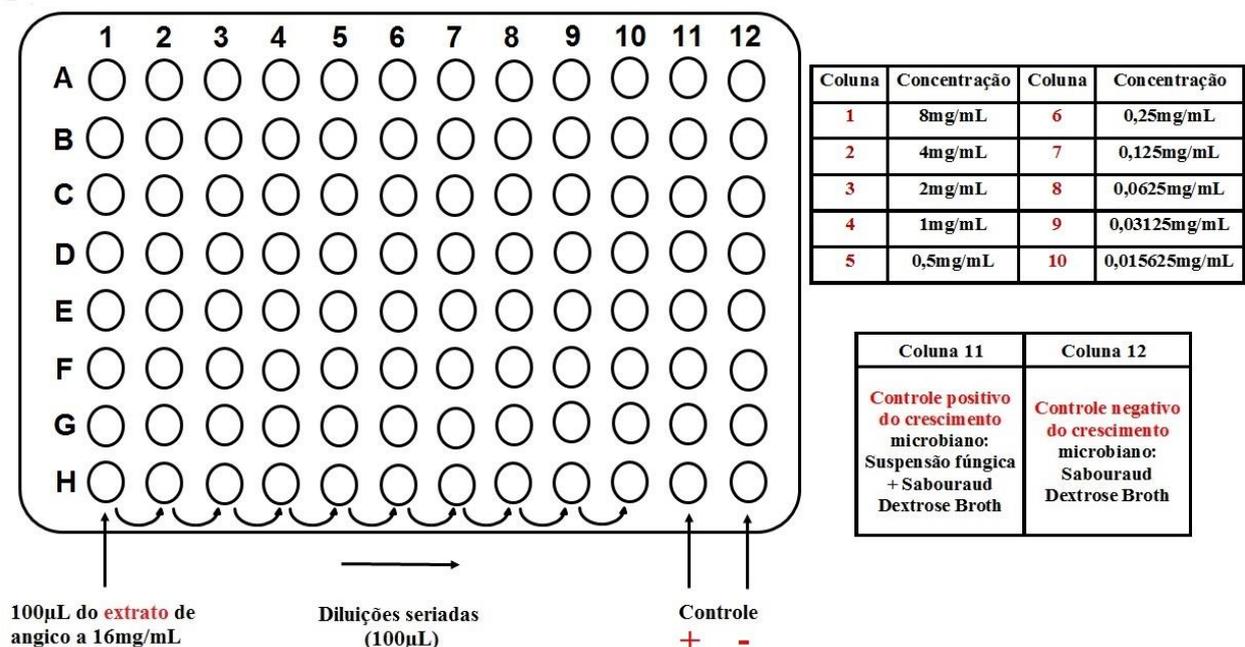
Após o período de incubação, foram adicionados 20 µL da solução aquosa de resazurina (Sigma-Aldrich®) a 0,01% em cada cavidade, como indicador colorimétrico para

caracterização da viabilidade celular. As placas foram mantidas a temperatura ambiente por 2h e interpretadas após esse tempo.

A leitura foi realizada de forma visual e caracteriza-se pela mudança de cor nas cavidades. Sendo a mudança de cor azul, da solução de resazurina, para rosa caracteriza a redução do corante indicando a viabilidade microbiana, ou seja, nas cavidades em que houve mudança de cor não houve inibição do crescimento fúngico.

Considerou-se como CIM a menor concentração de angico capaz de inibir o crescimento da cepa microbiana ensaiada, ou seja, capaz de impedir o aparecimento da coloração rosa.

FIGURA 06: Esquema metodológico da determinação da CIM do extrato hidroalcoólico da casca da *A. colubrina* pela técnica da microdiluição em placa



Fonte: Autor, 2014

4.6 Estudo do efeito do extrato de *Anadenanthera colubrina* sobre a cinética fúngica

A cinética fúngica, ou curva de morte, é um método experimental capaz de determinar a viabilidade das cepas ensaiadas após mantê-las em contato com as substâncias teste por um determinado tempo (MAY et al., 2000). Para Cantón e Pemán (1999), a determinação da viabilidade dos micro-organismos, seja seu crescimento ou mortalidade, em função do tempo de exposição a um determinado produto em estudo é uma das inúmeras ferramentas úteis para determinar *in vitro* os efeitos de antimicrobianos.

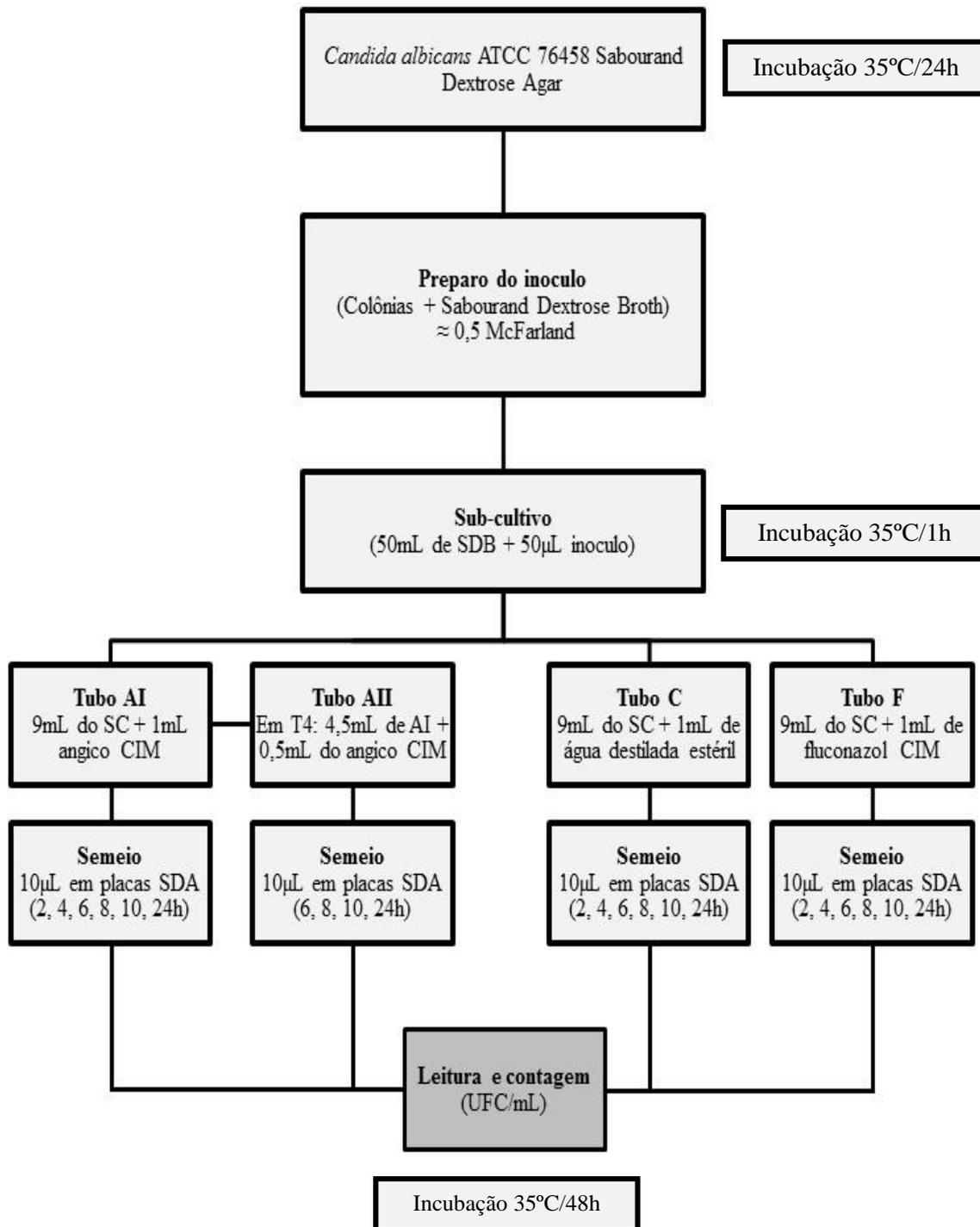
O estudo do efeito do extrato de *A. colubrina* sobre a *C. albicans* ATCC® 76485 foi realizado através do método de contagem de células viáveis. Neste ensaio, frente à concentração inibitória mínima do angico (1 mg/mL). A amostra foi semeada Sabouraud Dextrose Agar e incubadas a 35°C/24h.

Após este período, preparou-se o inóculo, transferindo-se colônias para um tubo com Sabouraud Dextrose Broth de modo a produzir uma leve turvação de densidade visualmente equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL). Após esse período, a cepa foi cultivada, transferindo-se 50 µL do inóculo inicial para 50 mL de Sabouraud Dextrose Broth, incubando-se à 35°C, por 1 hora. Em seguida, transferiu-se 9 mL deste sub-cultivo para um tubo teste (AI), 9 mL para um tubo controle (C) e 9 mL para um tubo padrão (F). No tubo AI, foram adicionados 1 mL do extrato de angico na concentração de 1 mg/mL (solubilizado em álcool etílico a 40%), no tubo C, adicionou-se 1 mL de água destilada estéril e no tubo F, adicionou-se 1 mL da solução de fluconazol a 8 µg/mL (solubilizado em água destilada estéril). Em T4, ou seja, após 4 horas de incubação dos tubos iniciais, realizou-se a administração da dose de reforço transferindo-se 4,5 mL do tubo AI para o tubo AII e adicionou-se a ele 0,5 mL do extrato de *A. colubrina* a 1 mg/mL (solubilizado em álcool etílico a 40%).

Os tubos (C, F, AI e AII) foram mantidos na estufa à 35°C e alíquotas foram retiradas após 2, 4, 6, 8, 10 e 24 horas (para os tubos C, F e AI) e após 6, 8, 10 e 24 horas (para o tubo AII) de incubação e semeadas em Sabouraud Dextrose Agar. O semeio aconteceu pela metodologia quantitativa por meio de alças estéreis com loop calibrado de 10 µL da marca CB Products®. As leituras das placas foram efetuadas após incubação por 48 horas a 35°C, pelo método padrão de contagem em placas com auxílio do contador de colônias CP600 plus Phoenix®. Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado final (UFC/mL) foi determinado pela média aritmética dos valores encontrados.

No fluxograma 3 é possível observar o esquema metodológico elaborado para o estudo da ação do extrato de angico sobre a cinética fúngica.

FLUXOGRAMA 03: Esquema metodológico do estudo da ação do extrato hidroalcoólico da casca da *A. colubrina* sobre a cinética fúngica

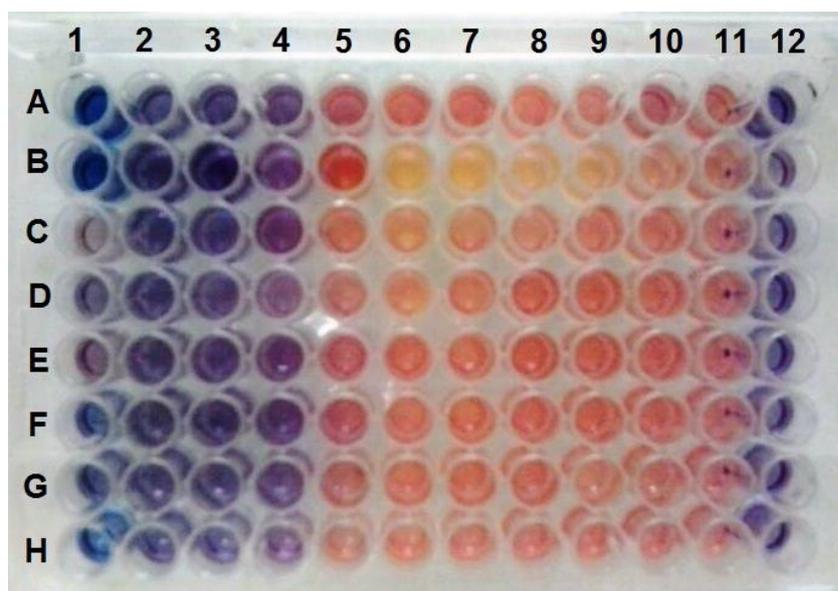


(continuação)

Concentrações do Extrato de <i>A. colubrina</i> (mg/mL)	Identificação das cepas de <i>Candida albicans</i>							
	ATCC 76485	LM 11	LM 94	LM 15	LM 520	LM 14	LM 70	LM 17
0,5	+	+	+	+	+	+	+	+
0,25	+	+	+	+	+	+	+	+
0,125	+	+	+	+	+	+	+	+
0,0625	+	+	+	+	+	+	+	+
0,03125	+	+	+	+	+	+	+	+
0,015625	+	+	+	+	+	+	+	+
Controle crescimento	+	+	+	+	+	+	+	+
Controle esterelidade	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: (+) Crescimento do micro-organismo; (-) Inibição do micro-organismo.

FIGURA 07: Avaliação da CIM do extrato hidroalcoólico da casca de *A. colubrina* frente às linhagens de *C. albicans* pela técnica de microdiluição



Legenda: *C. albicans* ATCC 76485 (linha A); *C. albicans* LM 11 (linha B); *C. albicans* LM 94 (linha C); *C. albicans* LM 15 (linha D); *C. albicans* LM 520 (linha E); *C. albicans* LM 14 (linha F); *C. albicans* LM 70 (linha G); *C. albicans* LM 17 (linha H); **Extrato** na concentração de 8 mg/mL (coluna 1), 4 mg/mL (coluna 2); 2 mg/mL (coluna 3); 1 mg/mL (coluna 4); 0,5 mg/mL (coluna 5); 0,25 mg/mL (coluna 6); 0,125 mg/mL (coluna 7); 0,0625 mg/mL (coluna 8); 0,03125 mg/mL (coluna 9) e 0,015625 mg/mL (coluna 10); **Controle positivo de crescimento** (coluna 11) e **Controle negativo** (coluna 12).

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do fluconazol frente às cepas ensaiadas foi de 8 µg/mL, também realizada pela técnica de microdiluição.

5.3 Avaliação da cinética fúngica

A tabela 04 apresenta o resultado do valor médio do efeito do angico sobre a linhagem *C. albicans* ATCC 76485, determinando-se o número de células viáveis através do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL), em função do tempo de exposição desses micro-organismos ao extrato hidroalcoólico em sua CIM (1mg/mL).

TABELA 04: Cinética fúngica da cepa *C. albicans* ATCC 76485, frente ao extrato da casca da *A. colubrina*

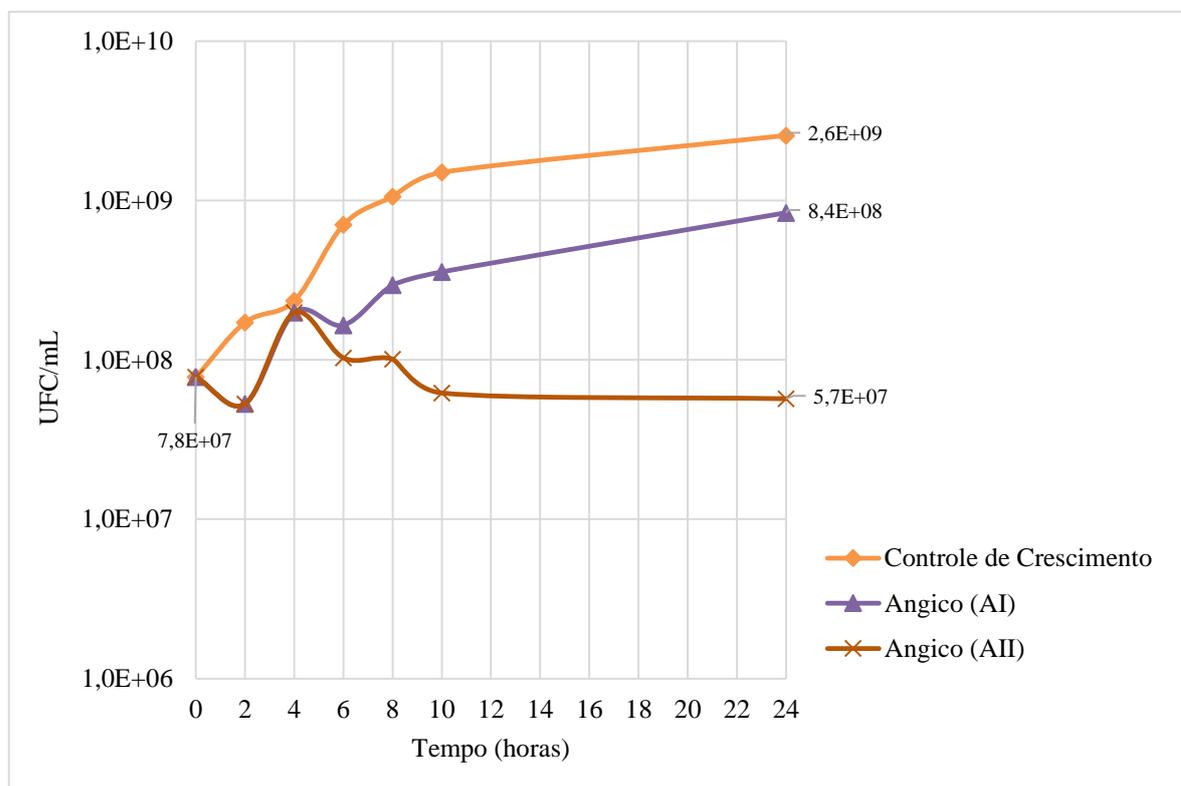
Tempo de exposição (horas/35°C)	Controle de Crescimento (UFC/mL)	<i>Anadenanthera colubrina</i> (1 mg/mL)	
		AI (UFC/mL)	AII (UFC/mL)
0h	7,80x10 ⁷	7,80x10 ⁷	7,80x10 ⁷
2h	1,72x10 ⁸	5,30x10 ⁷	5,30x10 ⁷
4h	2,35x10 ⁸	1,98x10 ⁸	1,98x10 ⁸
6h	7,04x10 ⁸	1,65x10 ⁸	1,00x10 ⁸
8h	1,06x10 ⁹	2,94x10 ⁸	1,00x10 ⁸
10h	1,50x10 ⁹	3,56x10 ⁸	6,20x10 ⁷
24h	2,55x10 ⁹	8,36x10 ⁸	5,70x10 ⁷

Foi observado que a linhagem tratada (*C. albicans* ATCC 76485) com extrato de *A. colubrina* apresentou discreto aumento na taxa de multiplicação celular nas primeiras horas de exposição quando comparada ao controle de crescimento sem adição do extrato de *A. colubrina*, com melhor efeito nos tempos de 0 até 6 horas. Quando se administrou apenas a dose inicial, ou seja o tubo AI, observou-se que nos tempos entre 8 até 24 horas a linhagem apresentou comportamento semelhante ao controle de crescimento.

Observou-se ainda que com a administração da dose de reforço, tubo AII, o extrato de *A. colubrina* conseguiu reduzir gradativamente ainda mais o número de células viáveis.

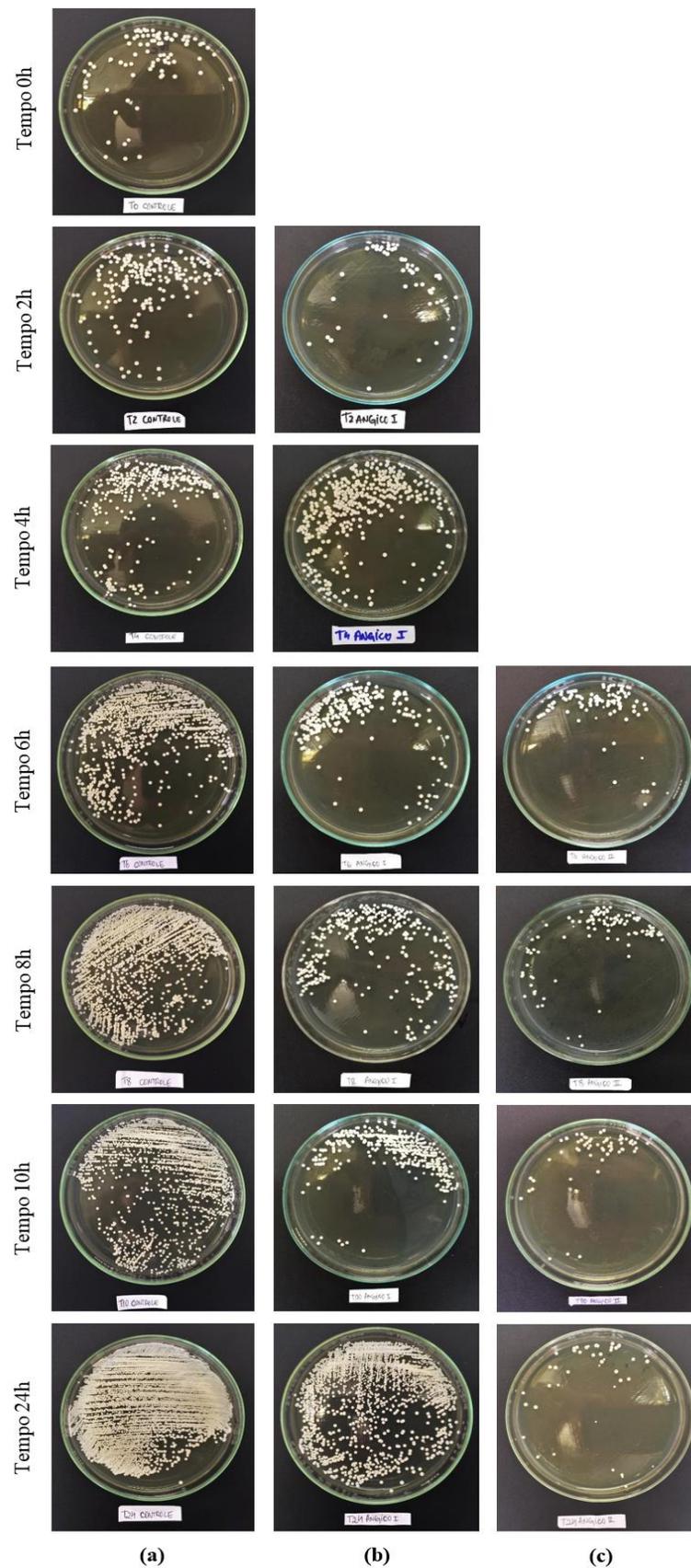
Constatou-se que o extrato da casca de *A. colubrina*, seja com a dose inicial (AI) ou com dose de reforço (AII), apresentou comportamento semelhante com ação fungistática, por não ser capaz de inviabilizar totalmente o crescimento da linhagem em estudo (*C. albicans* ATCC 76485), reduzindo o número de células viáveis em comparação ao controle de crescimento (Gráfico 01).

GRÁFICO 01: Cinética fúngica da cepa *C. albicans* ATCC 76485, frente ao extrato da casca da *A. colubrina*



A figura 8 apresenta o efeito do angico sob a *C. albicans* ATCC 76485 a partir da visualização da redução gradual do número de micro-organismos (UFC/mL). É possível observar, de forma comparativa, a evolução do crescimento fúngico, nesta linhagem inoculada com e sem adição do extrato da *A. colubrina* na dose inicial e na dose de reforço, comprovando a redução significativa dos micro-organismos após exposição por diferentes intervalos de tempo de incubação a 35°C.

FIGURA 08: Demonstração do efeito do extrato hidroalcoólico da casca da *A. colubrina* sobre a cinética fúngica



Legenda: (a) controle de crescimento; (b) dose inicial – tubo AI; (c) dose de reforço – tubo AII.

6 DISCUSSÃO

As plantas são importantes fontes naturais para obtenção de novos compostos químicos e matéria-prima para a indústria farmacêutica. É de grande interesse da comunidade científica o desenvolvimento de pesquisas que abordem o uso racional dos fitomedicamentos para o tratamento de diversas doenças. A Portaria nº 3916/98 que aprova a Política Nacional de Medicamentos estabelece no âmbito de suas diretrizes, o desenvolvimento científico e tecnológico atestando que o apoio às pesquisas deverá ser contínuo e expandido visando o aproveitamento do potencial terapêutico da flora e fauna nacionais e enfatizando a certificação de suas propriedades medicamentosas (BRASIL, 2006).

O Brasil praticamente não dispõe de estatísticas que indiquem a confiabilidade e uso de plantas medicinais em seu território; um estudo de 2007 avaliou o consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro e com a finalização da pesquisa observou que 97,7% dos entrevistados afirmaram utilizar plantas para fins medicinais regularmente (VEIGA JUNIOR, 2008).

O grande obstáculo a ser superado nesse campo é a obtenção de uma regulamentação no emprego dos fitoconstituintes para que sejam usados de maneira mais racional e segura e, para isso, torna-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que elucidem a estrutura química de modo a tornar possível a exploração das propriedades terapêuticas de modo eficaz.

As pesquisas com extratos vegetais estão explorando a ação antimicrobiana, o que representa uma grande alternativa para o combate aos micro-organismos, em razão do aumento da resistência a múltiplos agentes antimicrobianos (SAMY; GOPALAKRISHNAKONE, 2010).

A *Anadenanthera colubrina* é usada na medicina tradicional para diferentes indicações terapêuticas como, por exemplo, no tratamento de problemas infecciosos de pele (MORS et al., 2000), o que sugere a presença de metabólitos com ação antimicrobiana. Os resultados apresentados por este estudo confirmam a atividade antifúngica do extrato hidroalcoólico da casca da *A. colubrina* frente a *C. albicans* e estão em concordância com os relatos de outros autores (WEBER, 2010; LIMA et al., 2014; NUNES, 2014).

Recente estudo do potencial antifúngico da *Anadenanthera colubrina*, foi relatado à capacidade do extrato hidroalcoólico do angico de inibir a formação de tubos germinativos da

Candida albicans ATCC 76485 (NUNES, 2014). Sabe-se que a patogenicidade do fungo no processo infeccioso está relacionada, especialmente, com a transição da forma de blastos para hifas o que garante a invasão tissular. Sendo assim, a formação do tubo germinativo constitui um importante fator de virulência do fungo, uma vez que essa estrutura garante a formação de micélios, oferecendo maior capacidade de aderência e penetração em células epiteliais humanas (YANG, 2003; KHAN et al., 2010) decorrente da maior secreção de enzimas capazes de degradar proteínas, lipídios e outros componentes celulares, facilitando a invasão (HUBE; NAGLIK, 2001).

Os dados encontrados em relação a atividade antimicrobiana podem ser atribuídos à presença dos metabólitos secundários identificados na triagem fitoquímica, principalmente a de compostos fenólicos. É possível encontrar, também na casca do angico, compostos como catequinas, flavonoides, saponinas, esteroides, taninos condensados, triterpenos e xantonas, os quais possuem comprovada atividade antimicrobiana (BRAGA et al., 2007; SANTOS et al., 2003).

O teor de flavonoides e taninos condensados encontrado foi semelhante ao relatado na literatura (SIQUEIRA et al., 2012; MONTEIRO et al., 2006). Estes são importantes metabólitos produzidos pelas plantas e que apresentam diferentes propriedades biológicas, entre elas a antimicrobiana (DALL'AGNOL et al., 2003; CORRALES et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2012; NUNES, 2014).

Houve diferença no teor de compostos fenólicos encontrado no rastreio com os retratados em outros estudos (MONTEIRO et al., 2005; SATORI, 2012). Neste estudo os resultados foram similares aos relatados por Weber (2010). Essa discrepância pode ser explicada pelo fato da produção dos metabólitos secundários ser interferidas pelos índices pluviométricos, fatores ambientais (MONTEIRO et al., 2005) e metodologia empregada (CARNEIRO et al., 2010; SARTORI, 2012) além disso a produção ocorre em função da interação direta planta-ambiente, em resposta a fatores biológicos e químicos externos (FREITAS et al., 2004).

A CIM do extrato de *A. colubrina* frente a *C. albicans* encontrada nesse estudo difere dos valores encontrados por Weber (2010) e Lima et al. (2014) que eram inferiores a 1mg/mL, isso pode ser explicado pela diferente metodologia empregada, uma vez que Weber (2010) utilizou cepas de *C. albicans* ambulatoriais isoladas da cavidade oral e Lima et al. (2014) utilizou cepas de *C. albicans* ATCC 18804. Além disso, as possíveis alterações metodológicas

utilizadas para obtenção do extrato da *A. colubrina* podem influenciar nestes resultados. O perfil de sensibilidade das cepas pode ser também um fator diferencial no comportamento obtido nos diferentes estudos, e fatores intrínsecos do micro-organismo, como alterações celulares capazes de reduzir a expressão dos alvos farmacológicos podem justificar essa diferença (ADONIZIO et al., 2006).

Com os resultados obtidos pela avaliação da cinética fúngica, este trabalho caracterizou que o extrato de *A. colubrina* apresentou comportamento semelhante e compatível com ação fungistática, por não ser capaz de inviabilizar totalmente o crescimento da linhagem em estudo (*C. albicans* ATCC 76458), porém foi capaz de reduzir o número de células viáveis em comparação ao controle de crescimento. Esta atividade ficou bem caracterizada no tempo até 6h de incubação, quando se administrou apenas a dose inicial, tubo AI, observando que nos tempos entre 8 até 24 horas a linhagem apresentou comportamento semelhante ao controle de crescimento. No entanto, com a administração da dose de reforço no tempo 4h, tubo AII, o extrato de *A. colubrina* conseguiu reduzir gradativamente ainda mais o número de células viáveis, chegando a redução de $2,55 \times 10^9$, no controle de crescimento, para $5,7 \times 10^7$ UFC/mL nas 24h de incubação. Estes dados estão em concordância com o estudo desenvolvido por Nunes (2014) que também observou melhor efeito nos tempos de 0 até 6 horas de exposição do extrato de *A. colubrina* frente a *C. albicans*.

De acordo com as definições de Jones et al. (2002) e Shelburne et al. (2004), a cinética fúngica de um produto é considerada satisfatória quando observa-se redução dos valores do inóculo teste (comparado ao inóculo controle inicial) para valores, respectivamente, iguais ou superiores a 2 log₁₀ UFC/mL e 3 log₁₀ UFC/mL, em até 24h de incubação, onde os graus menores de morte celular são considerados como efeito fungistático.

A pesquisa por novos compostos terapêuticos antimicrobianos e a avaliação das interações com agentes já comercializados, podem contribuir significativamente no tratamento de infecções resistentes as terapias convencionais, reduzindo os efeitos adversos de drogas, prolongando a duração do efeito, impedindo ou retardando o surgimento da resistência microbiana, além de aumentar a eficácia e reduzir a dose administrada (CORDEIRO; CHUNG; SACRAMENTO, 2005).

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos *in vitro* pode-se concluir que o extrato hidroalcoólico da casca da *A. colubrina* apresenta:

- Teores de: 53,18% de polifenóis totais, 8,73% de taninos condensados e 0,28% de flavonoides, mediante caracterização fitoquímica;
- Atividade antifúngica frente a linhagens de *C. albicans*;
- Concentração Inibitória Mínima (CIM) capaz de exercer efeito fungistático sobre a linhagem de *C. albicans* em estudo;
- Maior capacidade de redução da carga fúngica (número de células viáveis - UFC/mL), quando se administrou a segunda dose (dose de reforço), quatro horas após a exposição do inóculo fúngico à dose inicial.

8 PERSPECTIVAS

A resistência fúngica está se tornando gradativamente num um sério problema mundial, podendo ser abordado sob vários aspectos, desde o entendimento dos processos relacionados à ação dos antifúngicos e ao surgimento da resistência, até o planejamento, a síntese e a avaliação farmacológica de novos agentes antifúngicos e suas aplicações terapêuticas.

O desenvolvimento de novos agentes antifúngicos pode ser alcançado pela elaboração racional de novas gerações de antimicrobianos, através de programas direcionados ao descobrimento de produtos naturais e sintéticos bioativos.

Considerando o efeito fungistático *in vitro* que o extrato de *A. colubrina* apresentou sobre linhagens de *C. albicans*, nesse estudo, sugere-se outras pesquisas sejam realizadas, tais como: o isolamento e identificação de seus compostos bioativos, a determinação de sinergismo e/ou antagonismo entre agentes antifúngicos convencionais, visando conhecer o mecanismo de ação dessa substância assim como a determinação de sua potencialidade e aplicabilidade terapêutica através de estudos *in vivo*, no sentido de encontrar métodos alternativos de controle de patógenos, através da produção de medicamentos fitoterápicos.

9 REFERÊNCIAS

ADONIZIO, A. L.; DOWNUM, K.; BENNETT, B. C.; MATHEE, K. Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 427-435, 2006.

AGRA M. F.; BARACHO, G. S.; NURIT, K.; BASÍLIO, I. J. L. D.; COELHO, V. P. M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 383–395, 2007.

ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 678-689, 2006.

ALBUQUERQUE, U. P.; OLIVEIRA, R. F. Is the use-impact on native caatinga species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 1, p. 156-170, 2007.

ALVES, P. M.; LEITE, P. H. A. S.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, L. F.; PEREIRA, M. S. V.; HIGINO, J. S.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn. (Goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: Uma avaliação *in vitro*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 192-196, 2006.

ANTUNES, R. M. P.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; CAMARA, C. A.; ARRUDA, T. A.; CATÃO, R. M. R.; BARBOSA, T. P.; NUNES, X. P.; DIAS, C. S.; SILVA, T. M. S. Atividade antimicrobiana "in vitro" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 517-524, 2006.

ARAÚJO, T. A. S.; ALENCAR, N. L.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 1, p. 72-80, 2008.

AWAD, A. B.; BARTA, S. L.; FINK, C. S.; BRADFORD, P. G. β -Sitosterol enhances tamoxifen effectiveness on breast cancer cells by affecting ceramide metabolism. **Molecular nutrition & Food research**, v. 52, n. 4, p. 419-426, 2005.

AWAD, A. B.; VON HOLTZ, R. L.; CONE, J. P.; FINK, C. S.; CHEN, Y.C. β -Sitosterol inhibits growth of HT-29 human colon cancer cells by activating the sphingomyelin cycle. **Anticancer research**, v. 18, n. 1^a, p. 471-473, 1998.

BARROS, M. B. **Apicultura**. Rio de Janeiro: Instituto de Zootecnia, 1960. 245p. (Instituto de Zootecnia. Série Monografias, 3).

BELTRAME, F. L.; PESSINI, G. L.; DORO, D. L.; DIAS FILHO, B. P.; BAZOTTE, R. B.; CORTEZ, D. A. G. Evaluation of the antidiabetic and antibacterial activity of *Cissus sicyoides*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 1, p. 21-25, 2002.

BENJAMIN, D. K. JR.; POOLE, C.; STEINBACH, W. J.; ROWEN, J. L.; WALSH, T. J. Neonatal candidemia and end-organ damage: a critical appraisal of the literature using meta-analytic techniques. **Pediatrics**, v. 112, n. 3, p. 634-640, 2003.

BENNETT, John E. Agentes Antifúngicos. In: GILMAN, Alfred Goodman; HARDMAN, Joel G.; LIMBIRD, Lee E. (Ed.). **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2005. Cap. 49. p. 971-984.

BLUMENTAHL, M. **Therapeutic Guide to Herbal: Complete German Commission e monographs**. Germany: American Botanical Council, 1998. 685 p.

BORGES, R. M.; SOARES, L. R.; BRITO, C. S.; BRITO, D. V. D.; ABDALLAH, V. O. S.; FILHO, P. P. G. Fatores de risco associados à colonização por *Candida* spp. em neonatos internados em uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 4, p. 431-435, 2009.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 2 ed. Fortaleza: Fundação Guimarães Duque, 2001. 496 p.

BRAGA, F. G.; BOUZADA, M. L.; FABRI, R. L.; MATOS, M. O.; MOREIRA, F. O.; SCIO, E.; COIMBRA, E. S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 396-402, 2007.

BRANDÃO, M. G. L.; COSENZA, G. P.; MOREIRA, R. A.; MONTE-MOR, R. L. M. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 408-420, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Ministério da Saúde. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde: Módulo 8: Detecção e identificação de fungos de importância médica**. 2. ed. Brasília, 2013. 47 p. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/5bec2d004e257546b098b3c09d49251b/Módulo+8+-+Detecção+e+identificação+de+fungos+de+importância+médicapdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 29 out. 2014.

BRASIL. Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006. **Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, jun. 2006.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos**. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 18 de março de 2004.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Brasília, 2007.

BRASIL. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006. **Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 4 mar. 2006.

BRESOLIN, T. M. B.; FILHO, V. C. Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. In: **Ciências Farmacêuticas**, Itajaí/Santa Catarina: Universidade do Vale do Itajaí, p. 239, 2003.

CANDIDO, R. C.; AZEVEDO, R. V. P.; KOMESU, M. C. Enzimatipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 5, p. 437-442, 2000.

CANTÓN, E.; PEMÁN, J. Curvas de letalidad en antifúngicos. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 16, p. 82-85, 1999.

CARNEIRO, A. D. C. O., VITAL, B. R., CARVALHO, A. M. M. L., OLIVEIRA, A. C., PEREIRA, B. L. C., ANDRADE, B. G. Determinação da massa molar de taninos vegetais através da técnica da cromatografia de permeação em gel. **Scientia Forestalis**, v. 38, n. 87, p. 419-429, 2010.

CARVALHO, D. D. C.; ALVES, E.; CAMARGOS, R. B.; OLIVEIRA, D. F.; SCOLFORO, J. R. S.; CARVALHO, D. A.; BATISTA, T. R. S. B. Plant extracts to control *Alternaria alternata* in Murcott tangor fruits. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 28, n. 4, p. 173-178, 2011.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira.** Brasília: EMBRAPA – SPI, 1994. 640 p.

CARVALHO, P. E. R. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Circular Técnica 56: Angico-Branco.** Colombo, 2002. 10 p.

CASTRO, R. D. **Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (canela) e de sua associação com antifúngicos sintéticos sobre espécies de *Candida*.** 2010. 170 f. Tese (Doutorado em Produtos naturais e sintéticos bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

CATÃO, R. M. R. **Atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre bactérias e fungos leveduriformes.** 2007. 126 f. Tese (Doutorado em Produtos naturais e sintéticos bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.

CATÃO, R. M. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; SILVA, M. A. R. S.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42, n. 1, p. 9-14, 2010.

CATALÁN, M.; MONTEJO, J. Antifúngicos sistémicos: Farmacodinamia y farmacocinética. **Revista iberoamericana de micología**, v. 23, n. 1, p. 39-49, 2006.

CHANDRA, S.; MEJIA, E. G. Polyphenolic compounds, Antioxidant capacity, and Quinone reductase activity of na 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. 11, p. 3583-3589, 2004.

CHEN, C. G.; YANG, Y. L.; SHIH, H. I.; SU, C. L.; LO, H. J. CaNdt80 is involved in drug resistance in *Candida albicans* by regulating *CDR1*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 12, p. 4505–4512, 2004.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**: Approved Standard, v. 28, n. 14, CLSI document M27-A3, Wayne, PA, USA, 3rd edition, 2008.

CORDEIRO, C. H. G.; CHUNG, M. C.; SACRAMENTO, L. V. S. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 272-278, 2005.

CORRALES, M; HAN, J. H.; TAUSCHER, B. Antimicrobial properties of grape seed extracts and their effectiveness after incorporation into pea starch films. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, n. 2, p. 425-433, 2009.

CORRÊA, A. D.; BATISTA, R. S.; QUINTAS, L. E. M. **Plantas Medicinais**: Do cultivo à terapêutica. 7. ed. Petrópolis: Vozes, 2008. 247 p.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 1, 2008.

COUTO, E. M. P.; CARLOS, D.; MACHADO, E. R. Candidíase em neonatos: uma revisão epidemiológica. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v.15, n. 4, p. 197-213, 2011. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=26022135014>>. Acesso em: 15 sep. 2014.

COWEN, L. E.; STEINBACH, W. J. Stress, Drugs, and Evolution: the Role of Cellular Signaling in Fungal Drug Resistance. **Eukaryot Cell**, v. 7, n. 5, p. 747-764, 2008.

DALAZEN, D.; ZANROSSO, D.; WANDERLEY, L.; SILVA, N.L. da; FUENTEFRIA, A.M. Comparação do perfil de suscetibilidade entre isolados clínicos de *Candida* spp. orais e vulvovaginais no Sul do Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 1, p. 33-38, 2011.

DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, A.P.; ALBRING, D.; NÖR, C.; SARMENTO, L.; LAMB, L.; HASS, M.; VON POSER, G.; SCHAPOVAL, E. E. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. **Phytomedicine**, v. 10, n. 6-7, p. 511-516, 2003.

DELGOBO, C. L.; GORIN, P. A. J.; JONES, C.; IACOMINI, M. Gum heteropolysaccharide and free reducing monosaccharides and oligosaccharides of *Anadenanthera colubrina*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1207-12148, 1998.

DEOUX, P.; DEOUX, S. **Ecologia é a Saúde**. Lisboa: Instituto Piaget, 1996. 568 p.

DESHPANDE, S. S.; CHERYAN, M.; SALUNKHE, D.K. Tannin analysis of food products. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 24, n. 4, p. 401-449, 1986.

DURIGAN, G.; NOGUEIRA, J. C. B. **Recomposição de matas ciliares**. São Paulo: Instituto Florestal, 1990. 14p. (IF. Série Registros, 4).

ESTEVAM, C. S. **Estudo fitoquímico biomonitorado da entrecasca de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae)**. 2006. 189 f. Tese (Doutorado em Química) 0 Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2006.

FARIAS, N. M. P.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica de óleos essenciais obtidos de plantas medicinais contra leveduras do gênero *Candida*: uma alternativa no controle da infecção hospitalar. **XVI Prêmio Jovem Cientista**. Edição: Saúde da população, controle da infecção hospitalar. Porto Alegre, 2000.

FARIDI, M. M. A.; ARORA, G. L.; DUA, T.; KHALIL, A. Infective endocarditis in a neonate: A case report. **Journal of Neonatology**, v. 21, n. 2, p. 142-143, 2007.

FERRETTI, A. R.; KAGEYAMA, P. Y.; ÁRBOCZ, G. F.; SANTOS, J. D.; BARROS, M. I. A.; LORZA, R. F.; OLIVEIRA, C. Classificação das espécies arbóreas em grupos ecológicos para revegetação com nativas no Estado de São Paulo. **Florestar Estatístico**, São Paulo, v. 3, n. 7, p. 73-84, 1995.

FREITAS, M. S. M; MARTINS, M. A.; CARVALHO, A. J. C.; CARNEIRO, R. F. V. Crescimento e produção de fenóis totais em carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares, na presença e na ausência de adubação mineral. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, p. 30-34, 2004.

GALVÁN, B.; MARISCAL, F. Epidemiología de la candidemia em UCI. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 23, n. 1, p. 12-15, 2006.

GONÇALVES, A. L. **Estudo da atividade antimicrobiana de algumas árvores medicinais nativas com potencial de conservação/recuperação de florestas tropicais**. 2007. 209 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

GONÇALVES, E. O.; PAIVA, H. N.; NEVES, J. C.; GOMES, J. M. Crescimento de mudas de angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan) sob diferentes doses de macronutrientes. **Árvore**, v. 32, n. 6, p. 1029-1040, 2008.

GONZÁLEZA, R. E. J.; CANALES, M. A. V.; MORALESB, H. E. G. Candidíasis mucocutánea crónica: Informe de un caso. **Archivos argentinos de pediatría**, v.108, n.2, p.37-40, 2010.

GOMPERTZ, O. F.; RIVERA, I. N. G.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R.; CORRÊA, B. Características Gerais das Micoses. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. Cap. 65. p. 461-470.

GOMPERTZ, O. F.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R.; CORRÊA, B. Micoses Oportunistas e outras Micoses. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. Cap. 70. p. 495-499.

GROSSI, P. A. Clinical aspects of invasive candidiasis in solid organ transplant recipients. **Drugs**, v. 69, n. 1, p. 15-20, 2009.

GUTIERREZ-LUGO, M. T.; DESCHAMPS, J. D.; HOLMAN, T. R.; SUAREZ, E.; TIMMERMENN, B. N. Lipoxygenase inhibition by anadanthoflavone, a new flavonoid from the aerials parts of *Anadenanthera colubrina*. **Planta Medica**, v. 70, n. 3, p. 263-265, 2004.

HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. **Journal of Chemical Ecology**, v. 15, p. 1795-1810, 1989.

HENDRY, E. R.; WORTHINGTON, T.; CONWAY, B. R.; LAMBERT, P. A. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 6, p. 1219-1225, 2009.

HERBRECHT, R. Voriconazole: therapeutic review of a new azole antifungal. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 2, n. 4, p. 485-497, 2004.

HUBE, B., NAGLIK J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology**, v. 147, p. 1997-2005, 2001.

JONES, R. N.; ANDEREGG, T. R.; DESHPANDE, L. M. AZT 2563, a new oxazolidinone bactericidal activity and synergy studies combined with gentamicina or vancomycin against staphylococci and streptococcal stains. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 43, n. 1, p. 87-90, 2002.

KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n.1, p. 120-128, 2008.

KHAN, M. S. A; AHMAD, I.; AQIL, F.; OWAIS, M.; SHAHID, M.; MUSARRAT, J. Virulence and Pathogenicity of Fungal Pathogens with Special Reference to *Candida albicans*. Combating Fungal Infections. In: AHMAD, I.; OWAIS, M.; SHAHID, M.; AQIL, F. **Combating Fungal Infection: problems and remedy**. Berlin: Springer, p. 21-45, 2010.

KIPRONO, P. C.; KABERIA, F.; KERIKO, J. M.; KARANJA, J. N. The *in vitro* Anti-fungal and Anti-bacterial activities of beta-sitosterol from *Senecio lyratus* (Asteraceae). **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 55, n. 5-6, p. 485-488, 2000 **Z. Naturforsch**, 55, 485-488, 2000.

LASS-FLÖRL, C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. **Mycoses**, v. 52, n. 3, p. 197-205, 2009.

LEWIS, R. E. Current concepts in antifungal pharmacology. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 86, n. 8, p. 805-817, 2011.

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.; GODOY, G. P.; COSTA, E. M. M. B. Antimicrobial and Antiproliferative Potential of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** Volume 2014, Article ID 802696, 7 pages, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/802696>>. Acesso em: 28 sep. 2014.

LIMA, M. R. F.; LUNA, J. S.; SANTOS A. F.; ANDRADE, M. C. C.; SANT'ANA, A. E. G.; GENET, J. P.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Antibacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105 n. 1-2, p. 137-147, 2006.

LOPES, E. A. Plantas medicinais. In: BONONI, V. L.; MACEDO, A. C. **Aproveitamento racional de florestas nativas**. São Paulo: Instituto de Botânica, 1986. p. 23-25.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. ed. São Paulo: Plantarum, v. 1, 1998.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.

LUCIGNANO, B.; RANNO, S.; LIESENFELD, O.; PIZZORNO, B.; PUTIGNANI, L.; BERNASCHI, P.; MENICHELLA, D. Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis. **Journal of Clinical Microbiology**, Itália, v.49, n. 6, p. 2252-2258, 2011.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Behaviour of tannic acid from various commercial sources towards redox, metal complexing and protein precipitation assays of tannins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 62, p. 295–299, 1993.

MANN, J. **Secondary metabolism**. 2. ed. Oxford: Clarendon Press, 1987. 374 p.
DEOUX, P.; DEOUX, S. **Ecologia é a Saúde**. Lisboa: Instituto Piaget, 1996. 568 p.

MANOHARLAL, R.; GAUR, N. A.; PANWAR, S. L.; MORSCHHÄUSER, J.; PRASAD, R. Transcriptional activation and increased mRNA stability contribute to overexpression of *CDRI* in azole-resistant *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1481-1492, 2008.

MARIE, C.; WHITE, T. C. Genetic basis of antifungal drug resistance. **Current Fungal Infection Reports**, v. 3, n. 3, p. 163-169, 2009.

MARTÍNEZ GUERRA, M. J.; BARREIRO, L. M.; RODRÍGUEZ, M. A.; RUBALCABA, Y. Actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Raddi (copal). **Revista Cubana de Plantas Mediciniais**, v. 5, n. 1, p. 23-23, 2000.

MARTINS, I. M. C. L. B. **Avaliação da ação antifúngica de *Citrus limon* Linn. frente a leveduras do gênero *Candida***. 2009. 76 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

MATOS, F. J. A.; ROCHA, F. D. D. **O formulário fitoterápico do professor Dias da Rocha:** informações sobre o emprego da medicina caseira, de plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. 2. ed. Fortaleza: EUFC, 1997. 258 p.

MAY, J.; CHAN, C. H.; FRENCH, G. C. Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, n. 5, p. 639-643, 2000.

MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOUJMA, O. G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkin Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food chemistry**, v. 91, n. 3, p. 571-577, 2005.

MEDEIROS, K. C.; MONTEIRO, J. C.; DINIZ, M. F. F. M.; MEDEIROS, I. A.; SILVA, B. A.; PIUVEZAM, M. R. Effect of the activity of the Brazilian polyherbal formulation: *Eucalyptus globulus* Labill, *Peltodon radicans* Pohl and *Schinus terebinthifolius* Radd in inflammatory models. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 23-28, 2007.

MENEZES, E. A.; GUERRA, A. C. P.; RODRIGUES, R. C. B.; PEIXOTO, M. M. L. V.; LIMA, L. S.; CUNHA, F. A. Isolamento de *Candida* spp. no mamilo de lactantes do Banco de Leite Humano da Universidade Federal do Ceará e teste de susceptibilidade a antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 5, p. 299-305, 2004.

MIMS, C.; DOCKERLL, H. M.; ROITT, I.; WAKELIN, D.; ZUCKERMAN, M. **Microbiologia Médica**. 3^a ed. Elsevier: São Paulo. 709p. 2005.

MOELLERING JR, R. C. Novos desafios no campo das doenças infecciosas. In: **Patógenos emergentes nas doenças infecciosas: Relatório Especial Hospital Práctice**. Euromédice: Ed. Médicas, 2000.

MONGE, R. A.; ROMA'N, E.; NOMBELA, C.; PLA, J. The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 152, n. 1, p. 905-912, 2006.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; LINS NETO, E. M. Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semiarid northeastern region. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n. 1-2, p. 173-186, 2006.

MORETÃO, M. P.; BUCH, D. F.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M. B. M. Effect of an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. **Immunology Letters**, v. 89, n. 2-3, p. 175-185, 2003.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A.; DeFILIPPS, R. A. **Medicinal plants of Brazil**. Michigan: Reference Publications, 2000. 372 p.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS – NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 2 ed. Tentative standard. NCCLS Documente M7-T2, V. B. n. B. Villa Nova PA, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004.

NAVARRO, D. F. **Estudo químico, biológico e farmacológico das espécies *Allamanda blanchetti* e *Allamanda schottii* Pohl para obtenção de frações e moléculas bioativas de potencial terapêutico.** 2005. 293 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

NOGUEIRA, F. L. C. **Prevalência de espécies do gênero *Candida* isoladas a partir de diferentes amostras clínicas e perfil de suscetibilidade *in vitro* ao fluconazol.** 2012. 15 f. Monografia (Especialização em Microbiologia Clínica) – Universidade Feevale, Novo Hamburgo, 2012.

NOGUEIRA, M. S. **Ação de produtos naturais sobre populações bacterianas.** 2000. 131 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

NUNES, L. E. **Potencial antifúngico da *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan (angico) associada ao fluconazol frente à *Candida albicans*.** 2014. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.

PACHTER, I. J.; ZACHARIAS, D. E.; RIBEIRO, O. Indole alkaloids of *Acer saccharinum* (the Silver Maple), *Dictyoloma incanescens*, *Piptadenia colubrina* and *Mimosa hostilis*. **Journal Organic Chemistry**, v. 24, n. 9, p. 1285-1287, 1959.

PAIVA, L. C. A.; RIBEIRO, R. A.; PEREIRA, J. V.; OLIVEIRA, N. M. C. Avaliação clínica e laboratorial do gel da *Uncaria tomentosa* (Unha de Gato) sobre candidose oral. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, p. 423-428, 2009.

PALMEIRA, J. D.; FERREIRA, S. B.; SOUZA, J. H.; ALMEIDA, J. M.; FIGUEIREDO, M. C.; PEQUENO, A. S.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P.; CATÃO, R. M. R. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos hidroalcoólicos de angico sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42, n. 1, p. 33-37, 2010.

PAULA, C. R.; KREBS, V. L.; AULER, M. E.; RUIZ, L. S.; MATSUMOTO, F. E.; SILVA, E. H.; DINIZ, E. M.; VAZ, F. A. Nosocomial infection in newborns by *Pichia anomala* in a Brazilian intensive care unit. **Medical Mycology**, v. 44, n. 5, p. 479-484, 2006.

PEREIRA, D. N.; NADER, S. S.; NADER, P.; MARTINS, P. G.; FURLAN, S. P.; HENTGES, C. R. Infecção disseminada por *Trichosporon* spp. em recém-nascido prematuro: relato de um caso. **Jornal de Pediatria**, v. 85, n. 5, p. 459-461, 2009.

PESSOA, W. S. **Avaliação do elixir Sanativo ® sobre o processo de alveolite dental induzida em ratos (*Rattus norvegicus albinus*).** 2008. 68 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal do Pernambuco, Recife, 2008.

PIRANI, J. R.; CORTOPASSI-LAURINO, M. **Flores e abelhas em São Paulo**. São Paulo: EDUSP / FAPESP, 1993. 192p.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. Fármacos Antifúngicos. In: RANG, H. P. et al. **Rang & Dale Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. Cap. 48. p. 692-697.

RIBEIRO, M. A.; PAULA, C.R. Up-regulation of *ERG11* gene among fluconazole-resistant *Candida albicans* generated in vitro: is there any clinical implication? **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 57, n. 1, p. 71-75, 2007.

RODRIGUES, A. C. C.; OSUNA, J. T. A.; QUEIROZ, S. R. O. D.; RIOS, A. P. S. Efeito do substrato e luminosidade na germinação de *Anadenanthera colubrina* (Fabaceae, Mimosoideae). **Árvore**, v. 31, n. 2, p. 187-193, 2007.

RODRIGUES, D.; MEZZARI, A.; FUENTEFRIA, A. M. Candidúria: revisão atual. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 24, n. 2, p. 142-150, 2011.

RODRIGUES, R. R. (coord.) **Trilhas do Parque da ESALQ: árvores medicinais**. Piracicaba: ESALQ, 1996. 28p.

SAMY, R. P.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Therapeutic potential of plants as anti-microbials for drug discovery. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine (ecam)**, v. 3, n. 7, p.283-294, set. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2887332/>>. Acesso em: 14 out. 2014.

SANTOS, J. S.; MARINHO, R. R.; EKUNDI-VALENTIM, E.; RODRIGUES, L.; YAMAMOTO, M. H.; TEIXEIRA, S. A.; MUSCARA, M. N.; COSTA, S. K.; THOMAZZI, S. M. Beneficial effects of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan extract on the inflammatory and nociceptive responses in rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 1, p. 218-222, 2013.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis: UFSC. Porto Alegre: UFRGS, 2007. Cap. 16. p. 403-434.

SARTORI, C. J. **Avaliação dos teores de compostos fenólicos nas cascas de *Anadenanthera peregrina* (Angico-vermelho)**. 2012. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia da Madeira) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2012.

SELMECKI, A.; GERAMI-NEJAD, M.; PAULSON, C.; FORCHE, A.; BERMAN, J. An isochromosome confers drug resistance in vivo by amplification of two genes, *ERG11* and *TAC1*. **Molecular Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 624–641, 2008.

SHAPIRO, R. S.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 2, p. 213-267, 2011.

SHELBURNE, S. A.; MUSHER, D. M.; HULTEN, K.; CEASAR, H.; LU, M. Y.; BHAILA, I.; HAMILL, J. R. Community-Associated Methicillin- Resistant

Staphylococcus aureus with drugs combinations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 10, p. 4016-4019, 2004.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. 1º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

SILVA, C. E. X. D. S.; BORNSTZTEIN, I. Candidíase Eritematosa: Relato de caso clínico. **Revista de Odontologia da Universidade de Santo Amaro**, v. 3, n. 2, p 77-79, 1998.

SILVA, P. Fármacos Antifúngicos. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 108. p. 1071-1078.

SILVA, V. V.; DIAZ, M. C. J.; FEBRE, N. Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. **Revista chilena de infectología**, v. 19, n. 2, p. 149-156, 2002.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELARAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods Enzymol**, v. 229, p. 152-178, 1999.

SIQUEIRA, C. F. D. Q.; CABRAL, D. L. V.; PEIXOTO SOBRINHO, T. J. D.S.; AMORIM, E.L.C.; MELO, J.G.; ARAÚJO, T.A.D.S.; ALBUQUERQUE, U.P. Levels of tannins and flavonoids in medicinal plants: evaluating bioprospecting strategies. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Article ID 434782, 7 p., 2012. doi: 10.1155/2012/434782.

SOUSA, M. P.; MATOS, M. E.; MATOS, F. J. A; MACHADO, M. I. L; CRAVEIRO, A. A. **Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras**. Campinas: UFC, 1991, 416 p.

SOUZA, E. L.; LIMA, E. O.; FREIRE, K. R. L.; SOUSA, C. P. Sensibilidade de fungos filamentosos isolados de alimentos frente a extratos vegetais. **Revista Higiene Alimentar**, v. 18, n. 124, p. 89-91, 2004.

SVETAZ, L.; AGUERO, M. B.; ALVAREZ, S.; LUNA, L.; FERESIN, G.; DERITA, M.; TAPIA, A.; ZACCHINO, S. Antifungal activity of *Zuccagnia punctata* cav.: Evidence for the mechanism of action. **Planta Medica**, v. 73, n. 10, p. 1074-1080, 2007.

TERRELL, C. L. Antifungal agentes. Part II. The Azoles. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 74, n. 1, p. 78-100, 1999.

TOMEI, R. R.; SALVADOR, M. J. Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. In: XI ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E VII ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 2007, São José dos Campos. **Anais**. São José dos Campos: 2007. p. 1963 - 1967.

TORRES, C. M.; REPKE, D. B. *Anadenanthera*: visionary plant of ancient South America. USA: Routledge, 2006. 340 p.

TRESOLDI, A. T.; BARISON, E. M.; PEREIRA, R. M.; PADOVEZE, M. C.; TRABASSO, P. Fatores de risco relacionados à aquisição de bactérias multirresistentes em unidade de internação pediátrica. **Journal of Pediatrics**, v. 76, n. 4, p. 275-280, 2000.

TSUCHIYA, H.; SATO, M.; MIYAZAKI, T.; FUJIWARA, S.; TANIGAKI, S.; OHYAMA, M.; IINUMA, M. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 50, n. 1, p. 27-34, 1996.

VEIGA JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: Aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista brasileira de Farmacognosia**, v. 2, n. 18, p. 308-313, 2008.

WAKIEC, R.; PRASAD, R.; MORSCHHAUSER, J.; BARCHIESI, F.; BOROWSKI, E.; MILEWSKI, S. Voriconazole and multirug resistance in *Candida albicans*. **Mycoses**, v.50, n. 2, p.109-115, 2007.

WANNMACHER, L. Antifúngicos. In: WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. **C. Farmacologia Clínica para Dentistas**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2007.

WEBER, C. R. **Determinação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos da casca do caule de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *Cebil* (Griseb.) Von Reis Alt. (angico-de-carço)**. 2010. 113 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

WINGETER, M. A.; GUILHERMETTI, E.; SHINOBU, C. S.; TAKAKI, I.; SVIDZINSKI, T. I. Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas da cavidade oral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 272-276, 2007.

WINK, M. Physiology of secondary product formation in plants. In: CHARLWOOD, B. V.; RHODES, M. J. C. (ed.). **Secondary products from plant tissue culture**. Oxford: Clarendon, 1990.

WISPELWEY, B.; PARSONS, C. H. Agentes antifúngicos. In: MINNEMAN, K. P.; WECKER, L. (Ed.). **Brody: Farmacologia Humana**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. Cap. 50. p. 593-602.

YANG, Y. L. Virulence factors of *Candida* species. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 36, p. 223-228, 2003.

ZOTCHEV, S. B. Polyene macrolide antibiotics and their applications in human therapy. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 211-223, 2003.