



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

ARELLA CRISTINA MUNIZ BRITO

**SENSIBILIDADE E ASPECTO MORFOLÓGICO DA *Candida albicans* TRATADA
COM O EXTRATO DA *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan**

**CAMPINA GRANDE
2017**

ARELLA CRISTINA MUNIZ BRITO

**SENSIBILIDADE E ASPECTO MORFOLÓGICO DA *Candida albicans* TRATADA
COM O EXTRATO DA *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan**

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

Orientadora: Profa. Dra. Edja Maria Melo
de Brito Costa.

**CAMPINA GRANDE
2017**

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

B862s Brito, Arella Cristina Muniz.

Sensibilidade e aspecto morfológico da *Candida albicans* tratada com o extrato da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan [manuscrito] / Arella Cristina Muniz Brito. - 2017.

23 p. : il. color.

Digitado.

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

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

1. Plantas medicinais. 2. Fabaceae. 3. *Candida albicans*. 4. Atividade antimicrobiana. I. Título.

21. ed. CDD 615.321

ARELLA CRISTINA MUNIZ BRITO

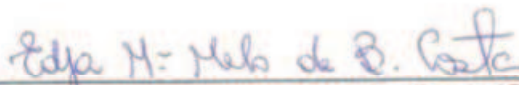
SENSIBILIDADE E ASPECTO MORFOLÓGICO DA *Candida albicans* TRATADA
COM O EXTRATO DA *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan

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

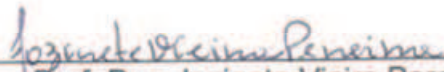
Área de concentração: Odontologia

Aprovado em: 11/04/2017

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



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



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

À minha família, por todo o apoio, dedicação e amor, DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por abençoar minha vida, por ser meu alicerce diário e zelar por mim ao longo da minha trajetória, permitindo que eu realizasse meus sonhos e objetivos.

Aos meus queridos pais, Ana Muniz e André Fiquene, minha imensa gratidão, pelo o apoio incondicional e dedicação de vocês. Obrigada por nunca terem medidos esforços, pelas palavras de incentivo, por sempre terem acreditado em mim. Vocês são aqueles que nunca hesitaram em me oferecer o melhor, mesmo que isso significasse abrir mão de seus próprios sonhos. Vocês são meus maiores exemplos, meus grandes amores, amo vocês. Obrigada, simplesmente por tudo.

Ao meu irmão, André Brito, pela amizade, companheirismo e pela forma que me ajuda a enxergar o mundo de uma maneira mais simples e prática. Muito obrigada às minhas avós, Nadir Muniz e Marília Fiquene, por terem auxiliado na minha criação, por serem tão queridas e especiais, e mesmo diante das dificuldades, conseguiram me ensinar tanto sobre a vida. A todos meus familiares, pelo apoio constante e incentivo, que apesar da distância, sempre torceram por mim.

À querida orientadora, Profa. Dra. Edja Costa, agradeço por ter me acolhido tão bem no grupo, ter acreditado em mim, por ter me proporcionado oportunidades, além de toda paciência, incentivo e apoio, tanto na pesquisa quanto em sala de aula e em clínicas. Muito obrigada por toda disponibilidade para dúvidas, por sempre procurar algum horário ou uma maneira de nos ajudar e por todo o ensinamento, sou extremamente grata.

Ao grupo de pesquisa, tive muita sorte de fazer parte de um grupo tão unido, repleto de pessoas especiais. Muito obrigada à Carolina Medeiros, Rennaly Lima, Diego Romário, Érika Ponchet, por sempre terem toda paciência para nos ensinar, por toda convivência, são pessoa admiráveis, competentes e aprendi muito com vocês, torço pelo sucesso de todos.

Às minhas amigas da iniciação científica, Priscilla Guimarães, que eu sempre pude contar para tudo que precisei, agradeço por tudo que dividimos durante esses anos, tanto os sufocos quanto às conquistas. À Tereza Vieira, por ter compartilhado comigo quase todas as experiências acadêmicas, desde dupla

de clínica às atividades extracurriculares, aprendemos muito durante esse tempo. À Paolla Reymund, que mesmo em pouco tempo, se tornou uma grande amiga e à Yane Marinheiro, por tudo que foi compartilhado. Agradeço à todas, vocês tornaram todas as responsabilidades da "IC" mais fáceis.

Aos amigos que fiz ao longo da graduação, Laíza Rocha e Lívia Rocha, por toda a nossa amizade, que construímos desde o primeiro de aula e que continua mesmo após greves e distância, vocês foram um grande presente, obrigada por dividir essa jornada não só acadêmica, mas de vida também. Ítalo Macedo, por todos os trabalhos, incentivo e apoio. Às meninas, Thayná Luna, Cinthya Sarmiento, Bianca Mendes e Mariana Moura, por todos os momentos divertidos que passamos, os congressos, alegrias, muito obrigada. E aos amigos Ítalo Lima e Vinícius Rodrigues, por tornarem os dias mais leves, principalmente no expurgo e nas clínicas.

À Mayara Brasileiro e Wenny Maria, pela amizade que cultivamos, à Josimere Pontes por todo suporte, incentivo e conselhos.

Aos colegas de turma, por toda convivência, entre todas as dificuldades, aprendemos muito ao longo da graduação.

A todos os professores que fizeram parte da minha formação, e que entre todos os nossos erros cometidos, buscaram transformá-los em acertos, eu não conseguiria concluir essa etapa sem seus ensinamentos.

À Francineide Guimarães, Gustavo Godoy, Maria Helena Catão, Jozinete Pereira, Silvio Romero, Alessandro Cavalcanti, Fernanda Mariz, Aluana Siqueira, Rilva Cardoso e Rosa Mariz, agradeço especialmente a todos por terem sido importantes em momentos acadêmicos

A todos os funcionários, por toda dedicação, disponibilidade, aprendi muito com todos vocês também.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
2 METODOLOGIA.....	9
2.1 Delineamento do estudo	9
2.2 Local do Estudo	10
2.3 Material Vegetal	10
2.4 Obtenção do extrato.....	10
2.5 Caracterização do potencial antifúngico.....	10
2.5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)	10
2.6 Análise da Morfologia celular.....	11
2.6.1 Padronização da suspensão microbiana	11
2.6.2 Preparo das amostras	12
2.6.3 Coloração com Calcofluor White e Análise em Microscópio óptico de fluorescência.....	12
2.6.4 Análise da formação do tubo germinativo em microscópio invertido	12
3 RESULTADOS	13
4 DISCUSSÃO.....	15
5 CONCLUSÃO	17
REFERÊNCIAS	19

SENSIBILIDADE E ASPECTO MORFOLÓGICO DA *Candida albicans* TRATADA COM O EXTRATO DA *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan

Arella Cristina Muniz Brito*

RESUMO

A candidose é uma das infecções mucocutâneas mais prevalentes na cavidade oral, causada principalmente pela espécie *Candida albicans*. É conhecida por acometer frequentemente pacientes imunocomprometidos e usuários de prótese total superior mal adaptada e/ou má higienizada. O objetivo deste estudo foi avaliar a sensibilidade e morfologia da *C. albicans* tratada com o extrato hidroalcoólico das cascas da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. O potencial antifúngico da *A. colubrina* (angico) foi determinado através da técnica da microdiluição em caldo, frente à espécie *C. albicans*, sendo duas cepas padrão (*C. albicans* ATCC 5314, *C. albicans* ATCC 90028) e dois isolados clínicos frescos da cavidade oral. Para análise morfológica foram realizadas duas técnicas, uma utilizando a coloração da *Candida* com Calcofluor White, com leitura em microscópio óptico de fluorescência, e a outra correspondeu à visualização do tubo germinativo, utilizando a técnica de adesão ao substrato abiótico e leitura em microscópio invertido. O extrato da *A. colubrina* apresentou forte atividade antifúngica frente às cepas e aos isolados clínicos frescos de *C. albicans* (CIM de 19,5 µg/mL e 39 µg/mL), com visíveis alterações morfológicas, em que foram observadas diminuição do volume celular, mudanças na parede celular e na formação do tubo germinativo. A *A. colubrina* possui potencial antifúngico frente a *C. albicans*, apresentando-se como uma fonte promissora de compostos bioativos para o desenvolvimento de produtos para o tratamento da candidose.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Fabaceae. *Candida albicans*. Produtos com ação antimicrobiana.

1 INTRODUÇÃO

A candidose oral é uma micose provocada por espécies do gênero *Candida* e constitui uma das infecções mais frequentes na cavidade oral (CORONADO-CASTELLOTE, JIMÉNEZ-SORIANO, 2013). Dentre as espécies de *Candida*, a *Candida albicans* é a mais comumente isolada e chega a ocorrer em cerca de 50% dos casos de candidose e em torno de 80% dos indivíduos saudáveis (SHAO et al,

* Aluna de Graduação em Odontologia na Universidade Estadual da Paraíba – Campus I.
Email: arellabrito@gmail.com

2007, GARCIA-CUESTA et al, 2014, KULLBERG, ARENDRUP, 2015, PAULONE et al, 2017).

Caracteriza-se como uma infecção oportunista, bastante comum em pacientes com supressão imunológica, como em pacientes com câncer, órgãos transplantados, doenças hematológicas e, especialmente, os afetados pela síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), estando presente em cerca de 80% a 90% de indivíduos portadores do vírus HIV (FIDEL, 2011, SANTOS, 2010, GARBEE et al, 2016, CLARK-ORDÓÑES et al, 2016). Essas condições, também, favorecem a evolução da candidose mucocutânea para a forma sistêmica, a candidemia, agravando o quadro de morbidade e os índices de mortalidade, constituindo assim um problema de saúde pública(SARDI et al, 2013)

Além dessas condições sistêmicas, outros fatores favorecem o desenvolvimento da candidose oral. Fatores locais podem contribuir na instalação da doença, como por exemplo, a hipossalivação, o uso de prótese total mal adaptada e com precárias condições de higiene. Nesses casos, a infecção é clinicamente denominada de estomatite protética, e geralmente classificada como candidose eritematosa (WILLIAMS et al, 2011, THILAKUMARA et al, 2016).

As espécies de *Candida* fazem parte da microbiota oral e quando estão em condições favoráveis ao seu potencial patogênico expressam fatores de virulência, que promovem a infecção. Dentre esses fatores, destacam-se as transições morfológicas, caracterizadas pela formação de tubos germinativos e hifas, expressão de adesinas, secreção de proteinases, culminando para a formação do biofilme (INCI et al, 2012). A compreensão dos estágios morfológicos da *C. albicans* é necessária para o desenvolvimento de terapias que possam tratar ou prevenir a candidose (BERMAN ; SUDBERRY, 2002)

O tratamento da candidose oral inclui comumente o uso da nistatina e/ou do miconazol. Apesar de serem eficazes, podem desencadear efeitos adversos, como disfunções gastrointestinais e dermatite de contato (BAKHSHI et al, 2012, DIAS et al, 2013). Além dos efeitos adversos, outra crescente preocupação diz respeito à resistência aos antifúngicos disponíveis no mercado (LUKASZUK et al, 2017). Sabe-se que os microrganismos buscam outros mecanismos para sobrevivência, em que

tentam diminuir a afinidade ao fármaco, reduzir seu acúmulo no interior das células, gerando modificações no metabolismo da célula para tentar contrabalançar o efeito do fármaco utilizado (VANDEPUTTE et al, 2012).

Nessa circunstância, novos antifúngicos, mais seguros e eficazes, são necessários como fonte renovável para a descoberta de novos compostos bioativos, e neste sentido, ressaltam-se as plantas medicinais como uma rica fonte de princípios ativos (ARIF et al 2009, SEN; SAMANTA, 2014; SWAMY e SINNIHAH, 2015).

Diversas plantas são usadas para fins medicinais pela população, dentre elas, destaca-se a *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, pertencente à família Fabaceae, encontrada no bioma Caatinga, principalmente no Nordeste brasileiro, conhecida popularmente por angico, angico-liso ou angico-branco (NEPOMUCENO et al, 2007; WEBER et al, 2011). Utilizada na medicina popular para o tratamento de infecções respiratórias, inflamações e odontalgias (ALBUQUERQUE et al, 2006; ARAÚJO, et al 2008).

As propriedades biológicas e terapêuticas da *A. colubrina* vêm sendo investigadas. O extrato das cascas da *A. colubrina* apresenta expressiva atividade frente ao *Streptococcus aureus* (PALMEIRA et al, 2010; ROCHA et al 2013), atividade antifúngica frente à *C. albicans* (CARVALHO et al, 2011; LIMA et al 2014, NUNES et al, 2015; SILVA, 2017), além de resultados favoráveis em relação a citotoxicidade *in vitro* e *in vivo* (SILVA, 2017).

O objetivo deste estudo foi avaliar a sensibilidade e morfologia de cepas padrão e isolados clínicos frescos da cavidade oral de *C. albicans* tratadas com o extrato hidroalcoólico das cascas da *Anadenanthera colubrina* (Vell.)Brenan. .

2 METODOLOGIA

2.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo experimental *in vitro*, com observação direta em laboratório (MARCONI; LAKATOS, 2011).

2.2 Local do Estudo

As análises foram realizadas no Laboratório de Análises e Diagnóstico, no departamento de Odontologia, e no Laboratório de Ecologia Aquática (LEAq), nas Três Marias, ambos na Universidade Estadual da Paraíba(UEPB), Campus I.

2.3 Material Vegetal

Foram coletadas as cascas da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan no município de Queimadas, região do semiárido da Paraíba (7° 22' 25"S, 35° 59' 32" W), no mês de setembro de 2013. A Autorização de acesso ao patrimônio genético para pesquisa científica/CNPq foi o processo nº: 010682/2015-5. O material foi acondicionado em sacos de papel e secos em estufa de ar circulante (FANEM®, modelo 330) a temperatura de 40°C até a obtenção de peso constante. O espécime testemunho foi depositado no herbário Manuel de Arruda Câmara da Universidade Estadual de Paraíba, Campus I, Campina Grande, Paraíba (nº667/ ACAM).

2.4 Obtenção do extrato

Para obtenção do extrato hidroalcoólico da casca da *A. colubrina*, foi realizado o processo de maceração por 48 horas, usando a proporção de 10 mg da planta para 25 mL de álcool etílico 80% (CARVALHO, et al 2011). Em seguida o solvente foi evaporado à vácuo a 40°C (Quimis® / Q344 M) e liofilizado (Labconco® / Freezone 4.5).

2.5 Caracterização do potencial antifúngico

2.5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

O potencial antifúngico foi analisado por meio da técnica da microdiluição em caldo, com determinação da concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima, frente às cepas de *Candida albicans* ATCC 5314 e *Candida albicans* ATCC 90028 e dois isolados clínicos frescos de *C. albicans* sob aprovação do comitê de ética da UEPB, em 15 de dezembro de 2015, com o número: 51779315.7.0000.5187, seguindo as normas estabelecidas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes.

A concentração inibitória mínima foi determinada em microplacas de 96 poços. Foram distribuídos inicialmente 100µL, em cada poço, de meio de cultura RPMI 1640 (Angus Buffers e Biochemicals, Niagara Falls, Nova Iorque, EUA). Em seguida, foram dispensados 100µL do extrato diluído em DMSO a 20% no poço inicial, numa concentração de 20mg/mL, sendo realizada posteriormente a microdiluição seriada de modo a obter concentrações entre 5000 e 4.882 µg/mL. Por último, foram distribuídos 100µL da suspensão microbiana com densidade de 5×10^3 células/mL, padronizada através da câmara de Neubauer. O controle positivo foi representado pela Nistatina 100µL/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Para a determinação da CIM utilizou-se, inicialmente, o método visual, em que foi considerada a mudança da cor do meio de cultura RPMI do rosa para o amarelo, indicando mudança de pH ocasionada pelo crescimento bacteriano. Na sequência da leitura, em cada poço foi adicionado um volume de 30 µL de resazurina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 0,01%, em que observa-se a alteração da cor azul para a rosa, decorrente do mesmo princípio da mudança de cor do meio de cultura, em que indica a presença de atividade respiratória. A CIM posteriormente foi avaliada através dos critérios definidos por Holetz (et al, 2002)

A determinação da CFM foi realizada por meio da adição de uma alíquota de 50 µL de cada poço com as concentrações igual e maiores do que a CIM, em placas de Petri, contendo meio Ágar Sabouraud Dextrose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Assim, a CFM foi definida como a menor concentração que inibiu o crescimento visível do microrganismo (CLSI, 2012). A verificação do perfil fungicida ou fungistático, dado pela razão CFM/CIM, foi determinado utilizando os critérios propostos por Siddiqui (et al, 2013).

2.6 Análise da Morfologia celular

2.6.1 Padronização da suspensão microbiana

Uma cultura de *Candida albicans* ATCC® 5314™ foi reativada, cujas células fúngicas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Em seguida, as células foram suspensas em meio de cultura caldo Sabouraud dextrose caldo (Himedia®), numa densidade de 1×10^6 UFC/mL, padronizada em câmara de Neubauer (KASVI®).

2.6.2 Preparo das amostras

O extrato da *A. colubrina* foi diluído em dimetilsulfóxido de sódio (DMSO) (Neon®) a 20%, obtendo-se três concentrações para avaliação: 20µg/mL, 200µg/mL, e 1000µg/mL. Essas concentrações foram determinadas de acordo com os resultados da CIM. No controle negativo, as células não receberam nenhum tipo de tratamento. No controle positivo as células foram tratadas com a Nistatina 100 µg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As amostras foram preparadas considerando um volume de 2 mL da suspensão microbiana e as diferentes concentrações do extrato. Foram incubadas sob agitação (Biomixer®, Taboão da Serra – SP), por 24 horas a 37°C (FANEM LTDA® São Paulo-SP).

2.6.3 Coloração com Calcofluor White e Análise em Microscópio óptico de fluorescência

Após o período de tratamento (incubação) foi removido de cada amostra um volume de 1mL para centrifugação durante 15 minutos e velocidade de 1500 rpm. O sobrenadante foi retirado, adicionou-se 150 µL de solução Calcofluor White (1 g/L) (Sigma-Aldrich) e as amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, 10 µL da suspensão das células coradas foram inseridas em lâmina de vidro e visualizadas sob campo brilhante e UV/DAPI, em Microscópio óptico de fluorescência (Zeiss®) com auxílio do Software ZEN Lite 2012(Zeiss®) (Adaptado de LAFFEY; BUTLER, 2005)

2.6.4 Análise da formação do tubo germinativo em microscópio invertido

Para análise da formação do tubo germinativo, foi removido um volume de 300 µL da suspensão microbiana tratada com o extrato e os controles, por 24 horas.

Esse volume foi dispensado em câmara de Uttermohl e incubado por 2 horas a 37°C (Estufa FANEM LTDA® São Paulo-SP). Em seguida, retirou-se todo o volume suspenso, permanecendo apenas o material depositado no fundo da câmara. Acrescentaram-se 100 mL de solução salina (NaCl) a 0,9% para não

ressecar as células fúngicas e prosseguiu-se com a leitura em microscópio invertido (Zeiss®), com identificação da formação do tubo germinativo.

3 RESULTADOS

O extrato da casca da *A. colubrina* apresentou forte atividade antifúngica, com concentração inibitória mínima igual ou menor a 39 µg/mL (HOLETZ et al, 2002) e perfil fungistático (SIDDIQUI et al, 2013) frente às cepas padrão e aos isolados clínicos frescos da cavidade oral de *C. albicans* (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição da concentração inibitória mínima e da concentração fungicida mínima do extrato da casca da *A.colubrina*, frente a *Candida albicans*.

MICROORGANISMO	CIM µg/mL	CFM µg/mL	CFM/CIM* µg/mL	CIM NISTATINA µg/mL
<i>Candida albicans</i> ATCC 5314	19.5	625	32*	1
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	19,5	625	32	1
<i>Candida albicans</i> (cepa clínica 01)	19.5	>500	**	3
<i>Candida albicans</i> (cepa clínica 02)	39	>500	**	3

Fungicida (CFM/CIM < 4) ou fungistático (CFM/CIM ≥ 4) (SIDDIQUI et al., 2013).

** Não foi possível determinar a razão CFM/CIM.

A microscopia de fluorescência revelou no controle negativo aglomerações celulares, com predomínio de leveduras e manutenção do arcabouço celular (Figura 1A). No controle positivo (nistatina) houve expressiva redução do número de células, com alterações em seu arcabouço e morfologia característica (Figura 1B). Em relação ao extrato da *A. colubrina*, foi observado que as células tratadas com as concentrações de 20 µg/mL e 200 µg/mL expressam predominantemente a forma ovóide, com presença de tubo germinativo e manutenção do arcabouço celular (Figuras 1C e 1D). As células tratadas com o extrato na concentração de 1000

$\mu\text{g}/\text{mL}$ apresentaram menor fluorescência, indicativo de alterações na parede celular (Figura 1E).

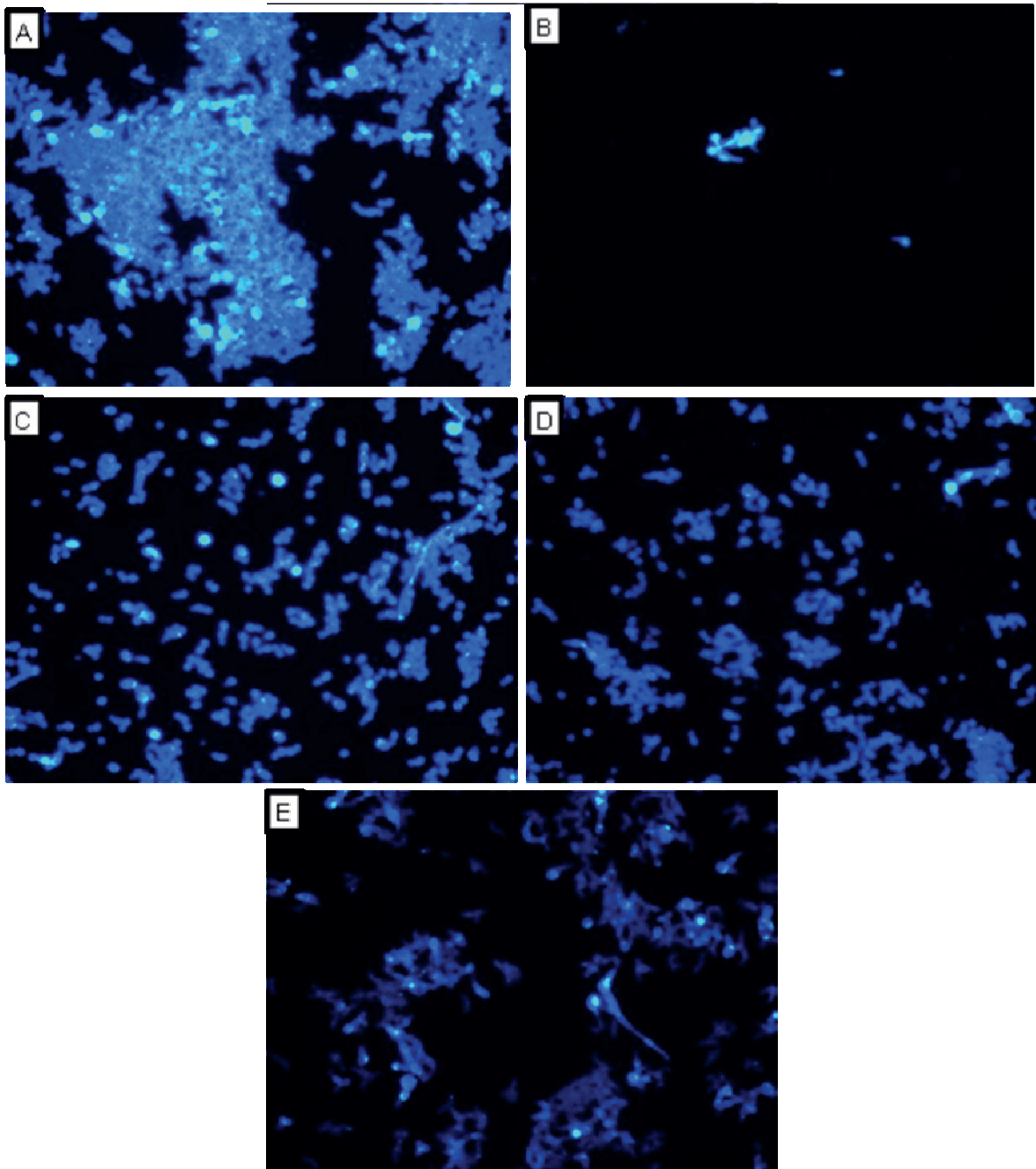


Figura 1. Microfotografia, através do microscópio óptico de fluorescência, da *Candida albicans* ATCC 5314 com aumento de 40 x. Controle negativo (Figura 1A). Controle positivo, *C. albicans* tratada com a Nistatina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 1B). *C. albicans* tratada com o extrato da *Anadenanthera colubrina* (vell.) Brenan nas concentrações de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 1C), 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 1D) e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 1E).

Na análise da morfologia da *C. albicans* em substrato abiótico, no controle negativo observou-se a formação do tubo germinativo e manutenção do arcabouço celular (Figura 2A). No controle positivo, tratado com a nistatina, foram observadas

reduções do volume celular e número de células (Figura 2B). As células tratadas com o extrato da *A. colubrina* na concentração de 1000 µg/mL apresentaram redução no volume celular, formação de botões e tubos germinativos, além de alterações morfológicas, em que as células apresentaram parede celular mais enegrecida e translucidez em seu interior, indicando perda de integridade celular (Figura 2C).

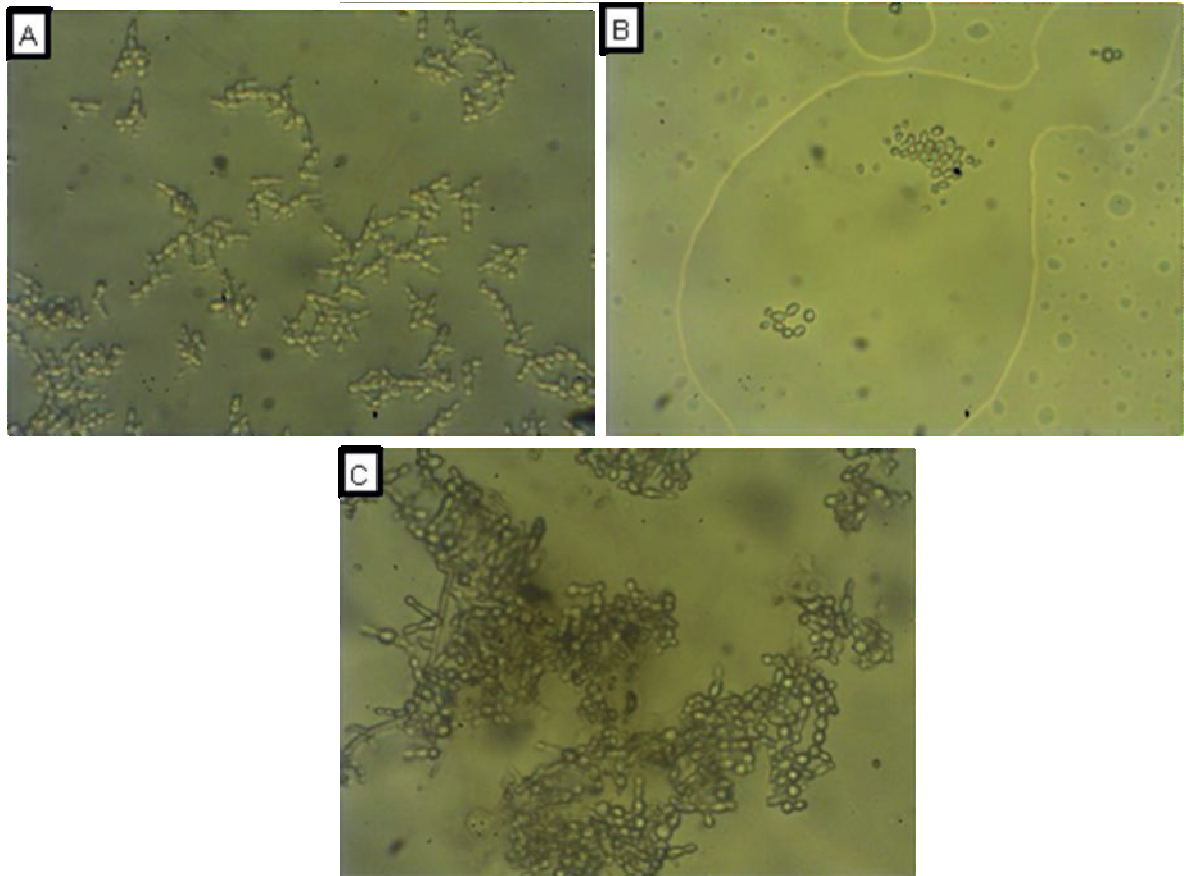


Figura 2. Microfotografia, através do microscópio óptico invertido, da *Candida albicans* ATCC 5314 com aumento de 40 x. Controle negativo (Figura 2A). Controle positivo, *C. albicans* tratada com a Nistatina 100µg/mL (Figura 2B). *C. albicans* tratada com o extrato da *Anadenanthera* na concentração de 1000µg/mL (Figura 2E).

4 DISCUSSÃO

A atividade antifúngica do extrato da *A. colubrina* vem sendo investigada com resultados positivos frente a *C. albicans* (CARVALHO et al, 2011, LIMA et al, 2014, NUNES et al, 2015, SILVA, 2017). Neste estudo, verificou-se que o extrato da casca da *A. colubrina* apresenta ação antifúngica frente a diferentes cepas e isolados clínicos frescos da *C. albicans*, cuja atividade foi considerada forte, conforme

classificação de Holetz (et al, 2002), em que a CIM foi menor do que $100\mu\text{g/mL}$. Lima (et al, 2014) verificaram forte atividade do mesmo extrato frente a outra cepa padrão de *C. albicans* ATCC 18804, com CIM de $31,25\mu\text{g/mL}$. Considerando esses resultados positivos frente a *C. albicans* e por esta espécie ser comumente associada à candidose oral, aponta-se a *A. colubrina* como uma possível fonte de princípios bioativos, que podem ser utilizados para o desenvolvimento de um antifúngico para o tratamento desta infecção.

Ao analisar a morfologia da *C. albicans*, através da microscopia de fluorescência, observou-se que o extrato, principalmente na concentração de $1000\mu\text{g/mL}$, conseguiu interferir visualmente na estrutura das células, havendo diminuição da fluorescência. Isto indica que o extrato da *A. colubrina* provoca alterações na parede celular, uma vez que o Calcofluor White tem a propriedade de se ligar a quitina presente na mesma (HAGEAGE; HARRINGTON, 1984, HALDANE; ROBBART, 1990, BRASIL et al, 2003). Na análise da formação do tubo germinativo em substrato abiótico, também foi possível observar alterações na morfologia da *C. albicans*, quando tratadas com o extrato da *A. colubrina*. Assim, ao considerar que a parede celular é um importante componente para a sobrevivência do microrganismo, responsável por manter a forma das células, mediar a comunicação entre o meio ambiente, e proteger a célula de possíveis danos osmóticos e físicos (LÓPEZ-RIBOT et al, 2004), sugere-se uma possível ação do extrato sobre a *C. albicans*, especialmente, sobre esse componente celular.

Em estudo prévio com o extrato da *A. colubrina*, nas concentrações de $31,25\mu\text{g/mL}$ e $2000\mu\text{g/mL}$, sobre biofilme de *C. albicans*, analisado por meio da microscopia eletrônica de varredura, também, foram observadas alterações na morfologia da *C. albicans*, com predominância de leveduras e poucas pseudo-hifas, principalmente na maior concentração (LIMA et al, 2014), o que reforça o potencial da *A. colubrina* ao exercer uma possível atividade na parede celular da *C. albicans*.

Considerando o estudo de SILVA (2017), estudo *in vivo* em larvas *Galleria mellonella*, em que constatou que apenas as doses entre 5 e 10g/kg do extrato da casca da *A. colubrina* afetam a viabilidade das larvas, existe um indicativo de que o extrato utilizado apresenta uma margem de segurança em relação à citotoxicidade, uma vez que as concentrações do extrato capazes de inibir o crescimento e

provocar alterações na *C. albicans*, ficaram abaixo de 1000 $\mu\text{g/mL}$. No entanto, são necessários outros testes para assegurar a sua segurança e eficácia.

5 CONCLUSÃO

Os resultados indicam que o extrato da casca da *A. colubrina* possui potencial antifúngico frente a *C. albicans*, com inibição do seu crescimento e indução de alterações morfológicas. Pode ser considerada uma fonte promissora de compostos bioativos, com vistas ao desenvolvimento de um fitoterápico para o tratamento da candidose. Sugere-se a continuidade de mais estudos que incluam caracterização fitoquímica, citotoxicidade, mecanismos de ação, entre outros, para que possam subsidiar a sua eficácia e segurança.

ABSTRACT

Candidosis is one of the most prevalent mucocutaneous infections existing in the oral cavity, mainly caused by *Candida albicans*. It is frequently associated to immunocompromised patients and users of poorly adapted and / or poorly sanitized upper total dentures. The aim of this study was to evaluate the sensitivity and morphology of *C. albicans* treated with the hydroalcoholic extract of the barks of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. The antifungal potential of *A. colubrina* (angico) was determined by broth microdilution technique against *C. albicans*, two standard strains (*C. albicans* ATCC 5314, *C. albicans* ATCC 90028) and two fresh clinical isolates of the oral cavity. Two techniques were used for morphological analysis, one using the *Candida* staining with Calcofluor White, with fluorescence optical microscopy, and the other with the visualization of the germ tube using the technique of adhesion to the abiotic substrate and reading under an inverted microscope. The extract of *A. colubrina* shown strong antifungal activity against *C. albicans* strains and fresh clinical isolates (MIC of 19.5 µg/mL and 39 µg / mL), with visible morphological alterations, in which cell volume decreased, demonstrating wall changes and alterations in the formation of the germ tube. Thus, *A. colubrina* has an antifungal potential against *C. albicans*, presenting itself as a promising source of bioactive compounds for the development of products for the treatment of candidosis.

Keywords: Medicinal plants. Fabaceae .*Candida albicans*. Products with antimicrobial action.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, U. P. et al. Evaluating Two Quantitative Ethnobotanical Techniques. **Acta Botanica Brasilica**, v. 4, p.51–60, 2006.
- ARAÚJO, T. A. et al. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, p.72–80, 2008
- ARIF, T. et al. Natural products – antifungal agents derived from plants. **Journal of Asian Natural Products Research**. v. 11, No. 7, p. 621–638, 2009.
- BAKHSHI, M. et al. Comparison of therapeutic effect of aqueous extract of garlic and nystatin mouthwash in denture stomatitis. **Gerodontology**. v.29, n.2, p.680-684, 2012.
- BERMAM, J.;SUDBERY, P. Candida albicans: A molecular revolution built on lessons from budding yeast. **Nature Reviews Genetics**. p.918-930, 2002
- BRASIL, K.W.; PINHEIRO, R.L.; PIMENTEL, I.C. Diagnóstico laboratorial de micoses superficiais e cutâneas: comparação dos métodos do hidróxido de potássio e do calcofluor White. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro , v. 78, n. 5, p. 547-551, Oct. 2003
- CARVALHO, D.D.C.; ALVES, E.; CAMARGOS, R.B. et al. Plant extracts to control *Alternaria Alternata* in Murcott Tangor fruits. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.28, n.4, p.173-178, 2011.
- CLARKK-ORDÓÑES, I. et al. Candida species diversity and antifungal susceptibility patterns in oral samples of HIV/AIDS patients in Baja California, Mexico. **Med Mycol**. 2016
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. M27-A3, v. 28, n. 14, 2012.

CONORADO-CASTELLOTE, L.; JIMÉNES-SORIANO, Y. Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. **J Clin Exp Dent**, v. 5, n. 5, p. 279-286, 2013.

DIAS, M.F.R.G. et al. Treatment of superficial mycoses: review - part II. **An Bras Dermatol**. v.88, n.6. p.937-44, 2013.

FIDEL, P. L. Candida-host interactions in HIV disease: relationships in oropharyngeal candidiasis. **Advances in Dental Research**, v.19, n. 1, p. 80-84, 2011

GARBEE, D.D.; PIERCE, S.S.; MANNING, J. Opportunistic Fungal Infections in Critical Care Units. **Crit Care Nurs Clin North Am**.v.29, n.1, p.67-79, 2017.

GARCIA-CUESTA, C.; SARRION-PERÉZ, M.G.; BAGÁN, J.V. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. **J Clin Exp Dent**. v.6, n.5, p.576-82. 2014

HAGEAGE, G.J.; HARRINGTON, B.J. Use of calcofluor white in clinical Mycology. **Lab Med**. p.109-112, 1984.

HALDANE, D.J.M.; ROBERT, E. A comparison of calcofluor white, potassium hydroxide, and culture for the laboratory diagnosis of superficial fungal infection. **Diagn Microbiol Infect Dis**.v.13, n.4, p.337-349,1990.

HOLETZ, F.B. et al. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97 (7), 1027-1031, 2002.

İNCI, M. et al. Investigating virulence factors of clinical Candida isolates in relation to atmospheric conditions and genotype. **Turkish J Med Sci**. v.42,p.1476-1483,2012.

KULLBERG, B. J., ARENDRUP, M. C. Invasive candidiasis. **N Engl J Med**,v. 373, p.1445-1456, 2015.

LAFHEY, S. F.; BUTLER, G. Phenotype switching affects biofilm formation by *C. parapsilosis*. **Microbiology**, v. 151, p. 1073–1081, 2005.

LIMA, R.F. et al. Antimicrobial and Antiproliferative Potential of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**.v.2014,p.1-7, 2014.

LÓPEZ-RIBOT J.L. et al. Antibody response to *Candida albicans* cell wall antigens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v.41, p.187-196, 2004.

ŁUKASZUK, C. et al. Retrospective observation of drug susceptibility of *Candida* strains in the years 1999, 2004, and 2015. **PeerJ** .v.5, p.1-12.2017

MARCONI, M.A. LAKATOS, E.M. **Técnicas de Pesquisa**. 7. ed. São Paulo:Atlas, 2011.

NUNES, L. E. et al. In vitro evaluation of antifungal activity and interactive effect of *Anadenanthera colubrina* (Benth). **African Journal of Microbiology Research**,v. 9, 2015.

NEPOMUCENO, C.F. Controle da abscisão foliar e morfogênese *in vitro* em culturas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Branana var. *cebilb* (Griseb) Altschul. **Revista Árvore**, v.31, n.5, p.967-975, 2007.

PAULONE, S.; et al.

Candida albicans survival, growth and biofilm formation are differently affected by mouthwashes: an in vitro study. **New Microbiol.** v.40, n.1, p.45-52, 2017..

PALMEIRA, J.D. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos hidroalcoólico de angico sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. **RBAC**. v.42, n.1, p.33-7,2010.

ROCHA, E. A. L. S. S. et al. Potencial antimicrobiano de seis plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 3, 2013.

SANTOS, A. L. S. HIV aspartyl protease inhibitors as promising compounds against *Candida albicans*. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 1, n. 2, p. 21-30, 2010.

Sardi, J.C., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A.M., Mendes Giannini, M.J., *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation. **J. Med. Microbiol.** v.62 , p.10-24, 2013.

SEN, T; SAMANTA, S.K. Medicinal Plants, Human Health and Biodiversity: A Broad Review. **Adv Biochem Eng Biotechnol**; v. 147, p. 59-110, 2015.

SHAO, L. C; SHENG; C.Q e ZHANG, W. Recent advances in the study of antifungal lead compounds with new chemical scaffolds. **Yao Xue Xue Bao** (Chinês), v. 42, n. 11, p. 1129-1136, 2007.

SIDDIQUI, Z.N. et al. Synthesis characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**. v.2, p.237-234,2013.

SILVA, D.R. Potencial antibiofilme contra espécies de *Candida* e toxicidade *in vitro* E *in vivo* da *Anadenanthera colubrina* vell. Brenan (angico).2017.70 f. Dissertação (Mestrando em Clínicas Odontológicas) – Universidade Estadual da Paraíba, UEPB. Campina Grande, 2017.

SUDBERY, P.; KIM, J. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. **The Journal of Microbiology**.v. 49, n.2, p.171-177, 2011.

SWAMY, M.K e SINNIAN, U.R. A Comprehensive Review on the Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Pogostemon cablin* Benth.: An Aromatic Medicinal Plant of Industrial Importance. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8521-8547, 2015.

THILAKUMARA, I.P. et al. Denture-induced stomatitis and associated factors in a group of patients attending a university dental hospital in Sri Lanka. **J Invest Clin Dent**. 2016

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A.T. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. **International Journal of Microbiology** v.2012, 2012.

WILLIAMS, D. W. et al. Candida biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. **Periodontology** 2000, v. 55, n. 1, p. 250-265, 2011.

WEBER, C.R. et al. Anadenanthera colubrina: um estudo do potencial terapêutico. **Revista Brasileira de Farmácia**; v. 92, n. 4, p. 235–244, 2011.