

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO
EXTRATO ETANÓLICO DE *Annona crassiflora*
Mart. FRENTE AS CEPAS DE *Candida albicans***

Raíres Chaves da Silva Rodrigues



João Pessoa – PB

2019

RAÍRES CHAVES DA SILVA RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO
ETANÓLICO DE *Annona crassiflora* Mart. FRENTE AS CEPAS DE
*Candida albicans***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Inovação de Produtos e Terapêutica dos Agravos em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Lúcio Roberto Cançado Castellano.

Coorientador: Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmiento Guerra.

João Pessoa – PB

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA SETORIAL DO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

BIBLIOTECÁRIO:

R696a Rodrigues, Raires Chaves da Silva.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO ETANÓLICO
DE *Annona crassiflora* Mart. FRENTE AS CEPAS DE *Candida*
albicans / Raires Chaves da Silva Rodrigues. - João
Pessoa, 2019.

47 f. : il.

Orientação: Lúcio Roberto Cançado Castellano.

Coorientação: Felipe Queiroga Sarmento Guerra.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. candidíase. 2. antifúngicos. 3. plantas medicinais.
4. atividade antifúngica. I. Castellano, Lúcio Roberto
Cançado. II. Guerra, Felipe Queiroga Sarmento. III.
Título.

UFPB/BC

RAÍRES CHAVES DA SILVA RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO
ETANÓLICO DE *Annona crassiflora* Mart. FRENTE AS CEPAS DE
*Candida albicans***

Banca Examinadora



Prof. Dr. Lúcio Roberto Cançado Castellano.

Orientador



Prof. Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan

Examinador interno - UFPB



Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola

Examinador Externo – UFU

Dedico este trabalho a minha avó (in memoriam) a senhora foi um anjo enviado por Deus para abençoar essa família, foi o ponto que nos manteve unidos por tanto tempo e a voz da sabedoria que guiou cada filho e cada neto aos melhores caminhos. Saiba que nunca vou esquecer todas as lições que vinham sempre acompanhadas de abraços e beijos. São elas que me farão cada vez mais uma pessoa decente e de sucesso. Te amo pra sempre.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida e por me permitir realizar tantos sonhos nesta existência. Obrigada por me permitir errar, aprender e crescer, por Sua eterna compreensão e tolerância, por Seu infinito amor, pela Sua voz “invisível” que não me permitiu desistir e principalmente por ter me dado uma família tão especial, enfim, obrigada por tudo. Ainda não descobri o que eu fiz para merecer tanto.

Ao meu querido Orientador **Prof. Dr. Lúcio Roberto Cançado Castellano**, para quem não há agradecimentos que cheguem. As notas dominantes da sua orientação foram a utilidade das suas recomendações e a cordialidade com que sempre me recebeu. Estou grata por ambas e também pela liberdade de acção que me permitiu, que foi decisiva para que este trabalho contribuísse para o meu desenvolvimento pessoal. Como professor foi o expoente máximo, abriu-me horizontes, ensinou-me principalmente a pensar. Foi, e é fundamental na transmissão de experiências, na criação e solidificação de saberes e nos meus pequenos sucessos. Obrigada por sempre acreditar e me apoiar em tudo.

Ao **Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmiento Guerra**, pela coorientação, competência, profissionalismo e dedicação tão importantes. Tantas vezes que nos reunimos e, embora em algumas eu chegasse desestimulada, bastavam alguns minutos de conversa e umas poucas palavras de incentivo e lá estava eu, com o mesmo ânimo do primeiro dia de aula. Obrigada por acreditar em mim e pelos tantos elogios e incentivos. Tenho certeza que não chegaria neste ponto sem o seu apoio. Você foi e está sendo muito mais que coorientador: para mim será sempre mestre e amigo.

Ao **Prof. Dr. Foued Salmen Espindola**, do Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG, por disponibilizar as amostras de extrato da planta utilizada e dar suporte ao projeto.

Ao professor **Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan** pela disponibilidade em participar das bancas de qualificação e defesa, com considerações que engrandeceram este trabalho.

À minha **mãe e ao meu pai** deixo um agradecimento especial, por todas as lições de amor, companheirismo, amizade, caridade, dedicação, abnegação, compreensão e perdão que vocês me dão a cada novo dia. Sinto-me orgulhosa e

privilegiada por ter pais tão especiais. E aos meus irmãos queridos, sempre prontos a me apoiar em tudo nesta vida.

A minha amiga **Danielle Nóbrega**, “meu braço direito” na execução deste projeto, sempre disposta a ajudar e a orientar. Agradeço também pelo companheirismo, apoio e carinho nesta jornada, a qual serviu para afinarmos nossa amizade.

A minha amiga **Patrícia Nérís**, “meu braço esquerdo” na execução deste projeto, também sempre solicita a me ajudar e orientar. Sendo duvida um dos melhores frutos desta pós-graduação foi a conquista da sua amizade.

A todos os professores da Pós-graduacao em Odontologia por terem contruibuido com o meu crescimento acadêmico-profissional.

Aos meus amigos da Pós-graduacao em Odontologia por terem contruibuido com o meu crescimento acadêmico-profissional, **Fabrício, Ésio, José Viana e Hugo**.

A aluna de mestrado do programa de pós-graduação do departamento de Nutrição (UFPB) **Karoliny Sampaio** pelo enorme suporte e ajuda na fase final desse projeto.

Ao aluno de doutorado do programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, **Hermes**, pelo auxílio no desenvolvimento desse trabalho.

Aos **colegas de sala e laboratório** pela companhia e apoio nas horas mais difíceis.

À Universidade Federal da Paraíba, e ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, pela oportunidade de crescer profissionalmente através da minha formação, apoio e participação em pesquisas.

Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

Tendo em vista a grande prevalência de candidíase oral, bem como as limitações dos antifúngicos sintéticos disponíveis no mercado, seja em relação aos efeitos colaterais, disponibilidade dos mesmos, e grau de susceptibilidade das cepas de *Candida albicans* nos pacientes, principalmente os imunossuprimidos, torna-se necessária a busca por novos produtos para o tratamento da doença. Os extratos de plantas podem ser promissores agentes terapêuticos. Assim, é fundamental intensificar as pesquisas em busca do melhor aproveitamento da biodiversidade no combate às infecções fúngicas. O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antifúngica do extrato etanólico de *Annona crassiflora* Mart., frente às cepas de *Candida albicans*. Realizou-se a determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM), interferência sobre a cinética de crescimento microbiano, mecanismos de ação sobre a parede e a membrana celular fúngica, atividade antifúngica sobre o biofilme, os efeitos citotóxicos sobre eritrócitos humanos. Nos ensaios de atividade antifúngica, o extrato etanólico de *A. crassiflora* Mart apresentou CIM e CFM que variaram de 256 µg/mL a 1024µg/mL. No ensaio de cinética de morte microbiana, o extrato demonstrou atividade fungicida ao inibir o crescimento das leveduras testadas ao final do período de 24 h, sem ser tempo dependente e com eficácia de inibição de crescimento diretamente proporcional a concentração utilizada. Foi observado que o mecanismo de ação não é por danos na parede celular, tampouco via metabolismo do ergosterol exógeno. Demonstrou-se, ainda, que o extrato não é citotóxico em eritrócitos humanos. Apresentou-se ação anti-biofilme ao reduzir o número de microrganismos viáveis em biofilme maduro. A partir dos resultados obtidos segere-se que o extrato etanólico de *A. crassiflora* Mart possa representar uma nova opção terapêutica no controle de *C. albicans*.

Descritores: candidíase, antifúngicos, plantas medicinais, atividade antifúngica.

Linha de pesquisa: Inovação de produtos e terapêutica dos agravos em saúde.

ABSTRACT

Given the high prevalence of oral candidiasis, as well as the limitations of commercially available synthetic antifungals, either in terms of side effects, availability, and degree of susceptibility of *Candida albicans* strains in patients, especially immunosuppressed patients, if necessary the search for new products for the treatment of the disease. Plant extracts may be promising therapeutic agents. Thus, it is essential to intensify research in order to make better use of biodiversity to combat fungal infections. The aim of this study was to evaluate the antifungal activity of ethanolic extract of *Annona crassiflora* Mart., facing the strains of *Candida albicans*. Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC), interference on microbial growth kinetics, mechanisms of action on the fungal cell wall and membrane, antifungal activity on the biofilm, cytotoxic effects on human erythrocytes. In antifungal activity assays, the ethanolic extract of *A. crassiflora* Mart showed MIC and MFC ranging from 256 µg/mL to 1024 µg/mL. In the microbial death kinetics assay, the extract showed fungicidal activity by inhibiting the growth of yeast tested at the end of the 24 h period, without being time dependent and with growth inhibition effectiveness directly proportional to the concentration used. It has been observed that the mechanism of action is not by damage to the cell wall, nor via exogenous ergosterol metabolism. It has also been shown that the extract is not cytotoxic in human erythrocytes. Anti-biofilm action was shown by reducing the number of viable microorganisms in mature biofilm. From the results obtained, it follows that the ethanolic extract of *A. crassiflora* Mart may represent a new therapeutic option in the control of *C. albicans*.

Keywords: candidiasis, antifungals, medicinal plants, antifungal activity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASD – Ágar Sabouraud Dextrose

ATCC - American Type Culture Collection

CCS – Centro de Ciências da Saúde

CIM (MIC) – Concentração Inibitória Mínima (Minimum Inhibitory Concentration)

CFM (MFC) – Concentração Fungicida Mínima (Minimum Fungicidal Concentration)

CNPq- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CSD – Caldo Sabouraud Dextrose

DCO - Departamento de Ciências Odontológicas

DMSO- Dimetilsulfóxido

EUA- Estados Unidos da América

EEAcM - Extrato etanólico de *Annona crassiflora* Mart.

HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana

LACEC- laboratório de Cultivo e análise celular

LLA- Leucemia Linfoblástica Aguda

OMS – Organização Mundial da Saúde

PL – Paciente Leucêmico

RPMI- Roswell Park Memorial Institute

UTI- Unidade de Terapia Intensiva

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1- Resultados da média da CIM ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos de plantas do cerrado brasileiro frente às cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. kruzei*, técnica de microdiluição.....p.45
- Quadro 2. Teor total de fenóis, flavonóides e proantocianidinas do extrato etanólico e frações orgânicas da casca do araticum (*Annona crassiflora* Mart)p.22

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Curva de crescimento microbiana da cepa *C.albicans* 90028, sob ação do extrato etanólico de *A. crassiflora* Mart.....p.30
- Figura 2. Curva de crescimento microbiana da cepa *C. albicans* PL A11, sob ação do extrato etanólico de *A. crassiflora* Mart.....p.31
- Figura 3. Efeito do extrato diclorometado de *A. crassiflora* Mart. sobre a viabilidade celular em eritrócitos humanos em 1 h de exposição.....p.36
- Figura 4. Porcentagem de biofilme de *C. albicans* tratados com diferentes concentrações do extrato diclometano da *A. crassiflora* Mart. e Nistatinap.38

LISTA DE TABELAS

- Tabela1. Resultados da avaliação da Concentração inibitória e fungicida mínima (CIM/CFM) do extrato etanólico de *A. crassiflora* Mart e nistatina sobre *C. albicans*. A CIM e CFM expressaram seus valores em $\mu\text{g/mL}$p.29
- Tabela 2: Valores de CIM ($\mu\text{g} / \text{mL}$) dos medicamentos e extrato na ausência e presença de sorbitol (0,8M) e ergosterol (400 $\mu\text{g} / \text{mL}$) frente *C. albicans* ATCC 90028 e *C. albicans* PL A11p.35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2. CAPÍTULO	19
2.1 INTRODUÇÃO	19
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	20
2.2.1 Local de Trabalho	20
2.2.2 Micro-organismos e reagentes.....	20
2.2.3 Extrato etanólico de <i>Annona crassiflora</i> Mart.....	21
2.2.4 Inóculo	22
2.2.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	22
2.2.6 Cinética de Morte Microbiana.....	23
2.2.7 Ação do extrato etanólico da <i>A. crassiflora</i> Mart na parede e membrana celular fúngica.....	24
2.2.7.1 Ensaio com Sorbitol	24
2.2.7.2 Ensaio com ergosterol	25
2.2.8 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico da <i>A. crassiflora</i> Mart. sobre redução do biofilme	25
2.2.9 Avaliação do potencial hemolítico em eritrócitos humanos.....	26
2.2.10 Análise de dados.....	26
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
2.3.1 Determinação dos valores da concentração inibitória mínima e fungicida mínima	27
2.3.2 Cinética de morte microbiana.....	30
2.3.3 Ação do extrato etanólico de <i>A. crassiflora</i> Mart na parede e membrana celular fúngica.....	33
2.3.3.1 Ensaio com sorbitol.....	33
2.3.3.2 Interação com Ergosterol	34
2.3.4 Avaliação do potencial hemolítico em eritrócitos humanos.....	35
2.3.5 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico de <i>A. crassiflora</i> Mart. sobre o biofilme	36
2.4 CONCLUSÃO	39
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS	40

REFERÊNCIAS.....	41
ANEXOS - CIM ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos de plantas do cerrado brasileiro	45

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Candida* spp. pertence à família das Cryptococcaceae, sendo *C. albicans* a principal espécie patogênica. Para a maioria das espécies do gênero, pode-se considerar duas formas morfológicas distintas (blastosporo e hifa), ambas capazes de provocar candidose. A parede celular de *Candida albicans* é constituída de 60% de β -glucana e cerca de 40% de manoproteínas e quitina (HUANG, 2012).

Candida spp. compreendem a causa mais frequente de infecções fúngicas em todo o mundo. O gênero contém várias espécies que apresentam considerável variação filogenética e fenotípica (KAMIMURA; CALDEIRA; AVILA, 2013).

Existem mais de 150 espécies conhecidas de *Candida*. No entanto, apenas 15 dessas espécies são isoladas de pacientes como agentes infecciosos, entre elas *C. albicans*. Embora as frequências de isolamento possam variar, nos últimos 20-30 anos, foi determinado que, em 95% das infecções, os patógenos envolvidos são *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*. Entre essas espécies, *C. albicans* ainda é o patógeno mais comum. (YAPAR, 2014).

As espécies de *Candida* colonizam a mucosa oral, porém, na presença de fatores predisponentes à levedura, podem se tornar patogênicas. Vários fatores predispõem à candidíase oral, como extremos de idade, uso de próteses dentárias, tabagismo, alterações salivares, hormonais, nutricionais e imunológicas. As manifestações bucais da candidíase incluem pseudomembranosa, eritematosa, hiperplásica, mucocutânea e queilite angular. *C. albicans* é responsável pela maioria dos episódios de candidíase oral (LI, XIAOXU *et al.*, 2013).

Candidíase oral é uma micose causada por leveduras do gênero *Candida*, em que a lesão pode ser branda, aguda ou crônica, superficial ou profunda, e de espectro clínico bem variável. O principal agente das candidíases é a *C. albicans*, constituindo na maioria dos superficiais e invasivos em diversos sítios anatômicos e como causa de candidíase em todas as partes do mundo. É a espécie de

Candida com maior conhecimento patogênico, devido à diversidade de fatores de virulência descobertos (FREIRE *et al.*, 2016).

Dentre os fatores de virulência associados a fungos do gênero *Candida* pode-se destacar: termotolerância (37°C), pH fisiológico, formação de hifas e pseudo-hifas, a capacidade de fenotipagem, aderência aos tecidos epiteliais endoteliais das células, formação de biofilme, secreção de enzimas (proteases, fosfolipases, lipases), e tropismos. Cada um desses atributos influencia o outro, e todos são essenciais para a patogenicidade dos fungos do gênero *Candida* (MODRZEWSKA; KURNATOWSKI, 2013).

O poder patogênico está particularmente bem estudado *C. albicans*, permitindo-nos afirmar que a relação parasita-hospedeiro é dependente não só de fatores do hospedeiro, mas também dos fatores de virulência do fungo. Dentre esses, são de realçar as capacidades de adesão e de formação de tubos germinativos e a produção de proteases extracelulares. Assim, *C. albicans* pode causar doença no homem por invasão tecidual, por indução de estados de hipersensibilidade ou por produção de toxinas (MODRZEWSKA; KURNATOWSKI, 2013).

O mecanismo prevalente para a transmissão da candidemia é por via endógena, em que espécies de *Candida* spp. que formam a microbiota de diversos sítios anatômicos, comportam-se como patógenos oportunistas, devido alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). Outro mecanismo de transmissão ocorre por via exógena, especialmente por manuseio de profissionais da saúde que tratam dos pacientes, também estão relacionados os materiais médico-hospitalares, principalmente cateteres e soluções intravenosas que estejam contaminadas por fungos (EGYDIO; VALVASSOURA; SANTOS, 2013; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Estas infecções são especialmente graves em indivíduos imunocomprometidos (aqueles com AIDS ou aqueles em tratamento com anticâncer ou imunossupressão) e pessoas saudáveis com dispositivos médicos implantados. Com relação as micoses superficiais que são geralmente causadas por vários organismos fúngicos, como *C. albicans*, que é o patógeno mais comum para a maioria das infecções micóticas em humanos (YAPAR, 2014).

Devido ao tratamento com agentes antineoplásico, que causam um déficit no sistema imunológico, inúmeras vezes estes pacientes em tratamento estão sujeitos a diversas infecções que podem levá-los a óbito, tanto por bactérias Gram-positivas quanto negativas, por vírus, fungos e parasitas (GABE; ALMEIDA; SIQUEIRA, 2009).

Segundo Giacomazzi *et al.*, (2016) aproximadamente 4 milhões de pessoas no Brasil devem ter infecções fúngicas a cada ano. Desse total, 2,8 milhões são infecções causadas por *Candida* spp. e um milhão por *Aspergillus* spp. que avançam principalmente em pessoas com defesas orgânicas enfraquecidas em razão do uso de medicamentos contra rejeição de órgãos transplantados, câncer ou Aids, do uso intensivo de antibióticos ou de procedimentos invasivos como sondas e catéteres em unidades de terapia intensiva (UTI).

Na terapêutica de candidíases destacam-se triazólicos, como miconazol, derivados poliênicos, como nistatina, e, do grupo das equinocandinas, a caspofungina. A anfotericina B é indicada para formas graves de doença invasiva, pertence ao grupo dos poliênicos (SANTOS; VIEIRA, 2017).

A nistatina pertence ao grupo dos poliênicos. São grandes moléculas que atuam na membrana celular fúngica, este agente demonstra propriedades anfipáticas, que permitem sua intercalação entre a membrana contendo ergosterol, induzindo a formação de poros. Os poros formados danificam as funções de barreira da membrana e alteram a permeabilidade da célula, ocorrendo o extravasamento de constituintes citoplasmáticos e consequentemente morte celular (BAGINSKI; CZUB, 2009; SOBCZYNSKI; CHUDZIK-RZAD, 2017).

Os antifúngicos azóis abrangem duas grandes classes, os imidazóis e os triazóis, que compartilham o mesmo espectro antifúngico e mecanismo de ação. Os mais empregados atualmente nos tratamentos das candidíases incluem os imidazóis (cetoconazol e miconazol), triazóis de primeira geração (fluconazol e itraconazol) e de segunda geração (voriconazol, posaconazol e ravuconazol) (BENNETT, 2007; MATHEW; NATH, 2009).

Entre os azólicos o mecanismo de ação, consiste na inibição da enzima lanosterol 14- α -demetilase codificada pelo gene *ERG11*, que impossibilita a conversão do lanosterol em ergosterol, provocando a redução do ergosterol e a acumulação de 14- α -metil-3,6-diol, produto tóxico sintetizado pela enzima δ -5,6-

desaturase, codificada pelo gene *ERG3*. Como consequência, ocorre alterações na função e estrutura da membrana e, por fim, a inibição do crescimento fúngico (SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLÖRL, 2015).



Fonte: Página Manah da terra no google.



Fonte: Página UNIVAR no google.

A caspofungina pertence ao grupo das equinocandinas e é administrada intravenosamente. Ela atua contra o crescimento de fungos através da inibição da β -1,3-D-glucanosintase. Este polímero é necessário para manter estável a estrutura das paredes celulares fúngicas, sendo que, na sua ausência, as células fúngicas perdem a integridade e ocorre a sua lise (ODDS; BROWN; GOW, 2003).

Com o aumento do uso de drogas antifúngicas, o número de relatos de resistência aos medicamentos antifúngicos também aumentou, o que evidencia ainda mais a necessidade de se compreenderem os mecanismos celulares moleculares envolvidos no desenvolvimento da resistência aos antifúngicos (SANTOS; VIEIRA, 2017). Dessa forma, há necessidade do desenvolvimento de novos fármacos de maior eficácia, dentre as possibilidades, surge a utilização de fitoterápicos como tratamento alternativo. Os mesmos se diferem por apresentar uma diversidade molecular superior aos sintéticos, proporcionando novas descobertas, com pesquisa nas atividades biológicas que podem favorecer na prevenção e tratamento de doenças (ANDRADE *et al.*, 2012).

Os extratos de plantas podem ser promissores agentes terapêuticos. A variedade de biomas reflete a enorme riqueza da flora e da fauna brasileira; o Brasil abriga a maior biodiversidade do planeta. Esta abundante variedade de vida – que se traduz em mais de 20% do número total de espécies da Terra – eleva o

Brasil ao posto de principal nação entre os 17 países de maior biodiversidade (BRASIL, 2018).

Porém, apesar de toda esta riqueza em forma de conhecimentos e de espécies nativas, a maior parte das atividades econômicas nacionais se baseia em espécies exóticas. Este paradoxo traz à tona uma ideia premente: é fundamental que o Brasil intensifique as pesquisas em busca de um melhor aproveitamento da biodiversidade brasileira (BRASIL, 2018).

Annona crassiflora Mart., popularmente conhecida como araticum, marolo ou pinha- do-cerrado, é uma das espécies arbóreas do cerrado com grande potencial alimentar e econômico. As sementes têm ação contra afecções parasitárias do couro cabeludo. Na medicina popular, a infusão de folhas e sementes em pó pode ser usada para combater a diarreia e induzir a menstruação (DE ALMEIDA *et al.*, 2016).

Além disso, a presença dos ácidos: ascórbico, cafeico, ferúlico, bem como as vitaminas A e C na casca e sementes sugerem uma excelente atividade antioxidante para esta espécie. Testes com ratos intoxicados com tetracloreto de carbono mostraram que extratos de sementes e casca de araticum têm alta atividade antioxidante *in vivo*, sugerindo potencial uso para fins terapêuticos (ROESLER, 2011).

Um estudo realizado por Roesler *et al.*, (2007) mostrou a presença de compostos fenólicos em um extrato bruto de etanol da casca de araticum, como rutina, acetogeninas, xantoxilina, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido ascórbico e ácido quinínico, indicando maior atividade antioxidante na casca do que na polpa.

Além das acetogeninas, vários alcalóides e flavonóides também foram encontrados nas folhas, polpa dos frutos, sementes e casca de *A. crassiflora* (EGYDIO; VALVASSOURA; SANTOS, 2013; JUSTINO *et al.*, 2016; LAGE *et al.*, 2014).

A Extração etanólica e partição líquido-líquido da casca do extrato da *Annona crassiflora* Mart realizada por Justino *et al.*, 2016 LC-ESI-MS / MS revelou a presença de vários componentes bioativos, como ácido clorogênico, (epi) catequina, procianidinas, cafeína-hexosídeos, quercetinglucosídeos e kaempferol, que podem estar associados a todas essas atividades biológicas verificadas *in vitro*.

Estudos também mostraram que extratos de diferentes partes da *A. crassiflora* tinham atividades antibacteriana, nematocida, antimalárica, antimutagênica, quimiopreventiva e terapêutica anti-inflamatória. Essas atividades têm sido associadas à presença de compostos bioativos, como moléculas fenólicas (VILAR *et al.*, 2008; DRAGANO *et al.*, 2010; PIMENTA *et al.*, 2014; MACHADO *et al.*, 2015; FORMAGIO *et al.*, 2015).

Diante do que foi abordado, o desenvolvimento de cepas resistente à terapia antifúngica observada nas espécies de *Candida albicans*, juntamente do desenvolvimento de resistência adquirida durante o tratamento antineoplásico, tem dificultado o manejo da candidíase oral. se tornando cada vez mais relevantes devido ao maior potencial dessa resistência a antifúngicos empregados na prática clínica, como também na necessidade de uma diminuição na citotoxicidade desses atuais fármacos empregados nessa terapia, requerendo muitas vezes uma nova abordagem antifúngica.

Devido ao crescimento evidente do número de patógenos resistentes aos fármacos atualmente disponíveis no mercado, é necessário descobrir novos agentes antimicrobianos. A este respeito, as plantas medicinais podem ser úteis devido à sua produção privilegiada de compostos químicos com várias funções terapêuticas.

É de fundamental importância o estudo de novos extratos vegetais com potencial promissor frente as cepas de *C. albicans*, isoladas da cavidade oral em pacientes oncológicos, para determinação de escala de atividades desse extrato, e conseqüentemente, estudar e experimentar sua inserção como uma nova opção terapêutica de qualidade.

Este estudo propôs avaliar a atividade antifúngica do extrato etanólico da *Annona crassiflora* Mart. contra cepas de *Candida albicans* isoladas da cavidade oral de pacientes oncológicos, por meio da determinação das concentrações inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM), como também avaliar a cinética de crescimento microbiano e biofilme, determinação do possível mecanismo de ação, além dos efeitos citotóxicos em eritrócitos humanos.

2. CAPÍTULO

2.1 INTRODUÇÃO

Existem mais de 150 espécies conhecidas de *Candida*. No entanto, apenas 15 dessas espécies são isoladas de pacientes como agentes infecciosos, entre elas *C. albicans*. Embora as frequências de isolamento possam variar, nos últimos 20-30 anos, foi determinado que, em 95% das infecções, os patógenos envolvidos são *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*. *C. albicans* ainda é o patógeno mais comum e o principal responsável pela maioria dos episódios de candidíase oral (YAPAR, 2014; LI, XIAOXU *et al.*, 2013).

Na terapêutica de candidíases destacam-se triazólicos, como miconazol, e derivados poliênicos como Nistatina e, anfotericina B, sendo esta a indicada para formas graves de doença invasiva, pertence ao grupo dos poliênicos (SANTOS; VIEIRA, 2017).

Com o aumento do uso de drogas antifúngicas, o número de relatos de resistência aos medicamentos antifúngicos também aumentou. (SANTOS; VIEIRA, 2017). Os extratos de plantas podem ser promissores agentes terapêuticos. *Annona crassiflora* Mart., popularmente conhecida como araticum, marolo ou pinha-do-cerrado, é uma das espécies arbóreas do bioma do Cerrado do Brasil, com grande potencial alimentar e econômico. (BRASIL, 2018).

Estudos mostraram que extratos de diferentes partes da *A. crassiflora* contém atividades antibacteriana, nematocida, antimalárica, antimutagênica, quimiopreventiva e terapêutica anti-inflamatória. Essas atividades têm sido associadas à presença de compostos bioativos, como moléculas fenólicas (VILAR *et al.*, 2008; DRAGANO *et al.*, 2010; PIMENTA *et al.*, 2014; MACHADO *et al.*, 2015; FORMAGIO *et al.*, 2015).

Tendo em vista a grande prevalência de candidíase oral, bem como as limitações dos antifúngicos sintéticos disponíveis no mercado, seja em relação aos efeitos colaterais, disponibilidade dos mesmos, e grau de susceptibilidade das cepas de *C. albicans* nos pacientes, principalmente os imunossuprimidos, torna-se necessária a busca por novos produtos para o tratamento da doença. As

plantas medicinais podem ser úteis devido à sua produção privilegiada de compostos químicos com várias funções terapêuticas.

Este estudo propôs avaliar a atividade antifúngica do extrato etanólico da *Annona crassiflora* Mart. contra cepas de *C. albicans* isoladas da cavidade oral de pacientes oncológicos, por meio da determinação das concentrações inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM), como também avaliar a cinética de crescimento microbiano, biofilme, determinação do possível mecanismo de ação, além dos efeitos citotóxicos em eritrócitos humanos.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Local de Trabalho

Os ensaios laboratoriais referentes ao estudo da atividade antifúngica foram realizados no Laboratório de Farmacologia Experimental e Cultivo Celular (LAFECC), Departamento de Ciências Odontológicas (DCO), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba.

2.2.2 Micro-organismos e reagentes

Para análise de Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Fungicida Mínima (CFM) e avaliação dos possíveis mecanismo de ação foram utilizadas quatro cepas de referência de *C. albicans* obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA), ATCC 90028, ATCC 60193 ATCC 76485 e ATCC 76645, e seis linhagens de *C. albicans* isolados clínicos de pacientes leucêmicos (PL), PL A1, PL A5, PL A8, PL A10, PL A11 E PL A15. Todas estas linhagens clínicas foram coletadas anteriormente (protocolo CAAE: 43911715.8.0000.5188), armazenadas a -2°C em Caldo Sabouraud Dextrose (CDS) (KASVI®, Curitiba, Brasil) suplementado por glicerol (40% v / v), em criotubos (2 mL). Essas linhagens clínicas foram cedidas pelo Laboratório de Cultivo e Análise Celular (LACEC) - ETS/UFPB para presente pesquisa (MONTEIRO; CAROLINA; DULGHEROFF, 2019).

Nistatina, caspofungina, Tween 80% , DMSO, ergosterol e sorbitol utilizados durante os ensaios, foram obtidos da Sigma-Aldrich® Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA) e o sorbitol (D-sorbitol anidro) do INLAB® (São Paulo, Brasil).

Para a manutenção das cepas e ensaios da atividade antifúngica, foram utilizados o Agar Sabouraud Dextrose – ASD, Caldo Sabouraud Dextrose – CSD (DIFCO LABORATORIES/USA/FRANCE), e Roswell Park Memorial institute - RPMI 1640-L-glutamina (LGC BIOTECNOLOGIA/BRASIL), preparados segundo as descrições dos fabricantes.

2.2.3 Extrato Etanólico de *Annona crassiflora* Mart

Para realização desse projeto, 41 extratos de plantas do cerrado brasileiro foram cedidos gentilmente pelo Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola do Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG, foram feitas triagens com os mesmos e o extrato diclometano de *A. crassiflora* Mart. foi o que apresentou melhores resultados com relação a atividade antifúngica (quadro 1 em anexo).

A. crassiflora Mart (Araticum) foi coletada em recursos naturais do Bioma Cerrado, na região norte de Minas Gerais, em março de 2015, por um comerciante de fardos do Cerrado. A planta foi identificada por André Vito Scatigna, do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia, em Uberlândia – MG, Brasil (JUSTINO *et al.*, 2016).

Um espécime de comprovante (HUFU68467) foi depositado no herbário da UFU (Herbarium Uberlandense). As cascas de araticum foram cuidadosamente transportadas para o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia e armazenadas a -20 °C até a análise. O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), sob a Resolução 246/2009, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, autorizou o acesso e embarque de componentes do patrimônio genético, n. 010743 / 2015-4 (JUSTINO *et al.*, 2016).

No quadro 2 é possível verificar a prospecção química do extrato etanólico da *Annona crassiflora* Mart (EEAcM).

Quadro 2: Teor total de fenóis, flavonóides e proantocianidinas do extrato etanólico e frações orgânicas da casca do araticum (*A. crassiflora* Mart).

Frações	Total teor Fenólico (mg GAE/g)	Flavonóides (mg QE/g)	Proantocianidinas (mg CE/g)
Et.	319.40 ± 7.41 ^a	15.97 ± 0.88 ^a	234.60 ± 2.50 ^a
Hex.	41.11 ± 0.69 ^b	13.74 ± 0.29 ^a	68.64 ± 1.73 ^{bc}
Dic.	57.11 ± 1.69 ^b	15.21 ± 0.10 ^a	49.38 ± 0.99 ^b
Et. ac.	497.90 ± 38.73 ^c	19.06 ± 0.67 ^a	757.50 ± 12.01 ^d
But.	383.90 ± 11.53 ^a	45.28 ± 4.19 ^b	458.90 ± 4.04 ^e
Aqu.	85.41 ± 1.30 ^b	4.11 ± 0.20 ^c	86.42 ± 8.36 ^c

Nota: Valores expressos em média ± erro padrão. Letras diferentes dentro de cada coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$). Et.: extrato bruto de etanol, Hex: fração hexana, Dic: fração etanólica, Et. ac.: fração acetato de etilo, But.: fração n-butanol, Aqu.: fração aquosa (Justino, et al., 2016).

Com objetivo de melhorar a solubilidade e, conseqüentemente, a qualidade dos procedimentos, tornou-se comum a utilização de solventes, detergentes, ou agentes emulsificadores, a exemplo do Tween 80% e DMSO, para facilitar a dispersão dos mesmos através do meio de cultura (BAYDAR *et al.*, 2004; BRUNI *et al.*, 2004). No entanto, deve-se levar em consideração que ao se introduzir um agente emulsificador, este está sujeito a possuir atividade antimicrobiana. No presente estudo, as cepas conseguiram tolerar as concentração de DMSO (5%) e de Tween 80 (2%) utilizadas na solubilização do EEAcM, confirmando que o impedimento do seu crescimento era conseqüência da presença do extrato no RPMI, não existindo interferência no crescimento das cepas pelo agente emulsificante utilizado na diluição do extrato.

2.2.4 Inóculo

A suspensão fúngica foi padronizada em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 530 nm, determinando-se uma absorbância entre 0,08 e 0,1, equivalente a $2,5 \times 10^3$ UFC / mL (CLSI, 2012).

2.2.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM).

A CIM foi determinada utilizando a técnica de microdiluição descrita pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS, 2002). A suspensão de levedura foi preparada em caldo RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) e ajustada com turbidez equivalente a $2,5 \times 10^3$ UFC / mL, 530 nm, abs 0,08-0,1.

Foram feitas diluições em série do extrato diclorometado da *A. Crassiflora* Mart em placas de microtitulação com 96 poços de fundo chato contendo RPMI, estéreis, em triplicata em três repetições independentes. Estas placas foram incubadas por 24 horas a 35 °C, e os resultados foram lidos por observação visual de agregados celulares no fundo dos poços. O extrato diclorometado da *A. Crassiflora* Mart foi testada nas concentrações que variaram de 8 µg/mL a 1024 µg/mL. A nistatina (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP) foi utilizada como controle positivo nos ensaios em concentrações que variaram 0,93 µg/mL a 120 µg/mL. Controles de viabilidade de crescimento, esterilidade média, DMSO (dimetil sulfóxido) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) utilizados para preparação de solução de Nistatina e Tween 80% (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) utilizados para preparação da solução de *Annona crassiflora* Mart, foram realizados simultaneamente com o ensaios.

A CFM foi definida como a menor concentração para inibir o crescimento visível em meio sólido. Alíquotas dos poços correspondentes à CIM em maiores concentrações foram subcultivadas em ágar Sabouraud Dextrose (KASVI1, Kasv Imp e Dist de Prod / Laboratorios LTDA, Curitiba, Brasil). Em seguida, as placas foram incubadas por 24 horas a 35 °C, e a leitura foi realizada por observação visual do crescimento fúngico no meio sólido. A razão CFM / CIM foi calculada para determinar se a substância obteve atividade fungistática ($CFM / CIM \geq 4$) ou fungicida ($CFM / CIM < 4$) (SIDDIQUI et al., 2013).

2.2.6 Cinética de Morte Microbiana

Procedimentos para o presente ensaio foram realizados utilizando a metodologia de Klepser et al., (1998) com algumas modificações. Curvas de tempo-morte foram utilizadas para avaliar o tempo mínimo necessário para a morte dos microrganismos. Numa placa de microdiluição de 96 poços de fundo plano foi adicionado meio de cultura a cada poço seguido do extrato a

concentrações correspondentes a CIMX2 (1024 µg/mL), CIM (512 µg/mL), CIM / 2 (256 µg/mL).

Finalmente, 100 µl de inóculos de levedura *C. albicans* ATCC 90028 e *C. albicans* clínicas (PL A11) ($2,5 \cdot 10^3$ UFC / mL) foram adicionados a cada poço. As placas foram incubadas por 24 horas a 35° C em leitor de microplacas (BIOTEK-EON) e os valores de absorbância foram lidos a 530 nm a cada quatro hora. A nistatina (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP) foi utilizada como controle positivo nos ensaios em concentrações variando de 1,5 a 12 µg/mL / L (1,5 a 12 µg / mL). O experimento foi realizado em triplicata.

2.2.7 Ação do extrato etanólico da *A. crassiflora* Mart na parede e membrana celular fúngica

2.2.7.1 Ensaio com Sorbitol

A CIM na presença de sorbitol (D-sorbitol anidro) (INLAB, São Paulo, Brasil), foi definida como a menor concentração da substância inibindo o crescimento microbiano visível (FROST *et al.*, 1995; CLERYA *et al.*, 2014). O mesmo foi utilizado na técnica de microdiluição com o objetivo de comparar os valores da CIM da *Annona crassiflora* Mart frente as cepas de *C. albicans* ATCC 90028 e *C. albicans* clínicas (PL A11) na ausência e presença de sorbitol 0,8µM. A técnica foi realizada seguindo os mesmos procedimentos descritos na seção 2.2.4. Em seguida, as placas foram incubadas a 35° C, e as leituras foram realizadas 24 horas após a incubação (FREIRES *et al.*, 2014; TAYLOR; LIMA; PEREIRA, 2013). O controle positivo deste ensaio foi a caspofungina na concentração inicial de 4 µg/mL (diacetato de caspofungina - Sigma-Aldrich, São Paulo - SP), visto que a mesma já tem sua atividade conhecida na parede celular da levedura (LETSCHER-BRU; HERBRECHT, 2003; PIERCE *et al.*, 2013; HAO *et al.*, 2013).

Baseado na capacidade do sorbitol atuar como protetor osmótico da parede celular fúngica, valores maiores de CIM observados em meios com adição de sorbitol (meio padrão) implica a parede celular como um dos possíveis alvos celulares do composto testado. Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.2.7.2 Ensaio com ergosterol

A CIM na presença de ergosterol foi definida como a menor concentração da substância inibindo o crescimento microbiano visível. O ensaio foi realizado utilizando a técnica de microdiluição, como descrito anteriormente, na presença de ergosterol exógeno (SigmaAldrich, São Paulo, Brasil) na concentração de 400µg/mL. As cepas utilizadas neste teste foram as mesmas do item 2 2.6.1 (TAYLOR; LIMA; PEREIRA, 2013).

As placas foram incubadas a 35° C e as leituras foram realizadas após 24h. A nistatina nas concentrações de 0,93 µg/mL a 120 µg/mL foi usada como controle positivo devido à sua atividade conhecida nas membranas das células de levedura por ligação aos esteróis da membrana e assim alterando a permeabilidade da membrana. Foi também incluído um controle com etanol a 96% e Tween 80%, que serão utilizados para preparação de soluções de ergosterol. Os ensaios foram realizados em triplicata (ELLEPOLA; SAMARANAYAKE, 2014).

2.2.8 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico da *A. crassiflora* Mart. sobre redução do biofilme

Para a análise da atividade antimicrobiana do EEAcM sobre a redução do biofilme Maduro, alíquotas de 100 µL do inóculo de quarto cepas escolhidas aleatoriamente de *C. albicans* (*C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* PL A10, *C. albicans* PL A11, *C. albicans* PL A15) contendo cerca de $2,5 \times 10^3$ UFC/m foram transferidas para uma placa de microdiluição de 96 poços previamente preenchida com 100 µL de meio RPMI, em temperatura ótima de crescimento a 35°C, permitindo a aderência da levedura. Após 24 horas de incubação, os poços foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS) para remover células fracamente ligadas, meio fresco foi adicionado, e as placas foram incubadas por mais 24 horas a 35°C.

Após as 48 h de incubação e o biofilme maduro formado, iniciou-se o ensaio para avaliação da redução do biofilme maduro, com inserção do extrato nas concentrações de 30, 20, 10 e 5 mg/mL.

Para quantificação do biofilme, os poços foram lavados três vezes com PBS, seco ao ar durante 45 min e tingido com 0,4% de solução de cristal violeta.

Os valores de absorvância foram lidos em 600 nm usando um leitor de placas. Também foram incluídos nos testes o controle de nistatina nas concentrações de 100, 50, 30 e 20 µg/mL, e o biofilme não tratado serviu como controle de crescimento. Os ensaios foram realizados em triplicata com controle de esterilidade sem a adição de micro-organismos e controle de crescimento de cada sepa separadamente (DJORDJEVIC *et al.*, 2002).

2.2.9 Avaliação do potencial hemolítico em eritrócitos humanos

Na citotoxicidade em eritrócitos humanos, a coleta de amostras de sangue periférico humano (cerca de 10 mL) foi realizada por punção de voluntários adultos e saudáveis, n = 04 (tipo sanguíneo A, B, AB e O), sendo perguntado antes a cada voluntário qual seu tipo sanguíneo (CAAE: 16861519.8.0000.5188), utilizando material estéril adquirido comercialmente (agulhas e seringas BD Plastipak® – BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e colhidos em tubos a vácuo (Greiner bione, Vacuette, Americana, SP, Brasil) contendo solução anticoagulante (RODRIGUES *et al.*, 2015).

Após a coleta, os eritrócitos foram diluídos em 80 µL de PBS, ajustando a concentração do sangue para 5% de hemácias. Em seguida foi adicionado o extrato etanólico de *A. crassiflora* Mart., em duplicata, nas concentrações seriadas de CIM a CIMx8, diluídos num volume de 20 µL de PBS. Logo após, foram incubados durante 1 h a temperatura ambiente e a reação foi interrompida pela adição de 200 µL de PBS (RODRIGUES *et al.*, 2015).

Em seguida, as suspensões foram centrifugadas a 1000g por 10 min a temperatura ambiente e o sobrenadante foi coletado e transferido para placas de 96 poços e mensurado em leitora de microplaca (550 nm). A ausência (controle negativo) e 100% de hemólise (controle positivo) foram determinadas, substituindo a solução de amostra testada com igual volume de PBS e água Milli-Q estéril (lise por choque hipotônico), respectivamente (RODRIGUES *et al.*, 2015).

2.2.10 Análise de dados

Os dados dos ensaios de CIM, CFM e mecanismo de ação foram

analisados por meio de estatística descritiva e inferencial. Para os ensaios de biofilme, curva de crescimento antimicrobiano e hemólise foram realizadas análises de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey através do programa GraphPad Prism (versão 7.0 para Windows, San Diego, CA - USA), tomando-se o valor de $p < 0,05$ como nível máximo de significância estatística.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Determinação dos valores da concentração inibitória mínima e fungicida mínima

Neste estudo, foi evidenciado efeito antifúngico do EEAcM sobre as 10 espécies fúngicas ensaiadas. Os valores da CIM e CFM para a *A. crassiflora* Mart e nistatina estão ilustrados na Tabela 1.

A. crassiflora Mart foi capaz de inibir o crescimento de 8 (80%) das 10 cepas de *C. albicans* até a concentração de 512 µg/mL, sendo uma destas cepas (ATCC 60193) inibida na concentração de 256 µg/mL. Apenas duas cepas (PL A10 e PL A15) inibiram na concentração de 1024 µg/mL. Para nistatina, foram observados valores de CIM e CFM que variaram de 7,5µg/mL a 60µg/mL.

A CFM do extrato variou entre 256 e 1024 µg/mL e a cepa que apresentou menor CFM foi *C. albicans* ATCC 60193. Na análise comparativa da CIM e CFM (Tabela 1) foi observado que, 4/10 cepas apresentaram os valores de CFM duas vezes maior que os valores de CIM, todas as outras cepas ensaiadas (6/10) apresentaram valores de CFM iguais aos valores da CIM. A relação CFM/CIM indicou que o extrato apresentou um efeito fungicida em todas as estirpes testadas.

As moléculas presentes em plantas apresentam uma enorme diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas, o que justifica o crescente interesse de indústrias farmacêuticas na síntese de fármacos a partir destas fontes naturais (BRESOLIN, FILHO, 2010). Extratos, frações e compostos isolados extraídos destas fontes têm sido estudados por pesquisadores por mostrarem significativas propriedades, entre estas a antimicrobiana (FRANCO; CORRÊA, 2000; HÖFLING *et al.*, 2010; ALBERNAZ *et al.*, 2010).

Na literatura a atividade antifúngica do extrato sobre os valores de CIM foi interpretada e considerada ativa ou não, conforme os seguintes critérios: 50-500 µg/mL= forte/ótima atividade; 600-1500 µg/mL= moderada atividade; acima de 1500 µg/mL= fraca atividade ou produto inativo (SARTORATTO *et al.*, 2004; HOUGHTON *et al.*, 2007). Enquanto Webster e colaboradores (WEBSTER *et al.*, 2008) propuseram um valor de CIM satisfatório entre 1000µg/mL ou menos.

Costa e colaboradores (2013) testaram a atividade antimicrobiana da *Annona salzmanni* (pertencente ao mesmo gênero da planta do presente estudo) contra cepa de *Candida albicans* que apresentou atividade antimicrobiana com valores mínimos de concentração inibitória (CIM) na faixa de 500 µg/mL (COSTA *et al.*, 2013).

Estudos anteriores realizados com amostras obtidas das folhas de *A. crassiflora* Mart. apresentaram efeito bactericida frente as três bactérias testadas. Foram ensaiados o extrato bruto das folhas de *A. crassiflora*, a fase alcaloídica enriquecida. Os resultados da atividade antimicrobiana das amostras apresentaram em concentração mínima inibitória de 50% do crescimento bacteriano (MIGUEL; HIDALGO, 2017).

Ainda, extratos de diferentes partes do fruto de *A. crassiflora* tinham atividades antibacteriana, antimalárica, antimutagênica, quimiopreventiva e terapêutica anti-inflamatória. Essas atividades têm sido associadas à presença de compostos bioativos, como moléculas fenólicas (EGYDIO; VALVASSOURA; SANTOS, 2013; JUSTINO *et al.*, 2016; LAGE *et al.*, 2014).

Este é um estudo pioneiro na determinação do perfil antifúngico do EEAcM. Estes resultados promissores apontam para a oferta de novos agentes antifúngicos, considerando especialmente os valores da CIM observados, além de seu caráter fungicida para todas as cepas testadas, e se tratando de cepas de pacientes isolados clínicos oncológicos com caráter mais significativo ainda.

Tabela1. Resultados da avaliação da Concentração inibitória e fungicida mínima (CIM/CFM) do extrato etanólico de *A. crassiflora* Mart e nistatina sobre *C. albicans*. A CIM e CFM expressaram seus valores em µg/mL.

<i>A. crassiflora</i> Mart					NISTATINA		
CEPA	CIM	CFM	$\frac{CFM}{CIM}$	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	CIM	CFM	$\frac{CFM}{CIM}$
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	512 µg/mL	512 µg/mL	1	Fungicida	7,5µg/mL	7,5µg/mL	1
<i>C. albicans</i> ATCC 60193	256 µg/mL	256 µg/mL	1	Fungicida	7,5µg/mL	7,5µg/mL	1
<i>C. albicans</i> ATCC 76485	512 µg/mL	1024 µg/mL	2	Fungicida	7,5µg/mL	7,5µg/mL	1
<i>C. albicans</i> ATCC 76645	512 µg/mL	1024 µg/mL	2	Fungicida	7,5µg/mL	7,5µg/mL	1
<i>C. albicans</i> PL A1	512 µg/mL	1024 µg/mL	2	Fungicida	7,5µg/mL	7,5µg/mL	1
<i>C. albicans</i> PL A5	512 µg/mL	512 µg/mL	1	Fungicida	60 µg/mL	60 µg/mL	1
<i>C. albicans</i> PL A8	512 µg/mL	512 µg/mL	2	Fungicida	15 µg/mL	15 µg/mL	1
<i>C. albicans</i> PL A10	1024 µg/mL	1024 µg/mL	1	Fungicida	15 µg/mL	15 µg/mL	1
<i>C. albicans</i> PL A11	512 µg/mL	512 µg/mL	1	Fungicida	7,5 µg/mL	7,5 µg/mL	1
<i>C. albicans</i> PL A15	1024 µg/mL	1024 µg/mL	1	Fungicida	7,5 µg/mL	7,5 µg/mL	1

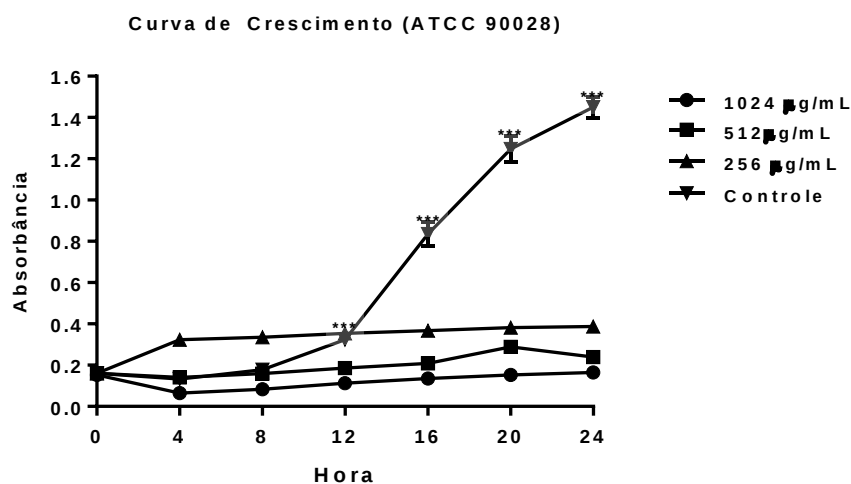
*CFM/CIM > 4 significa que é fungistático, <4 significa que é fungicida

2.3.2 Cinética de morte microbiana

Com base nos resultados dos valores de CIM encontrados, curvas de tempo de morte foram construídas para duas cepas de *C. albicans* selecionadas aleatoriamente (ATCC 90028 e Isolada Clínica PL A11), a fim de avaliar o efeito de diferentes concentrações do extrato etanólico de *A. crassiflora* Mart ao longo do tempo.

Os resultados dos ensaios da cinética microbiana foram expressos em gráficos que mostram curvas da absorbância de *C. albicans* ATCC 90028 (Figura 1) e *C. albicans* PL A11 (Figura 2) em função do tempo, na ausência do extrato (controle), na presença da CIMx2 (1024 µg/mL), CIM (512 µg/mL) e CIM / 2 (256 µg/mL) do extrato etanólico de *A. crassiflora* Mart.

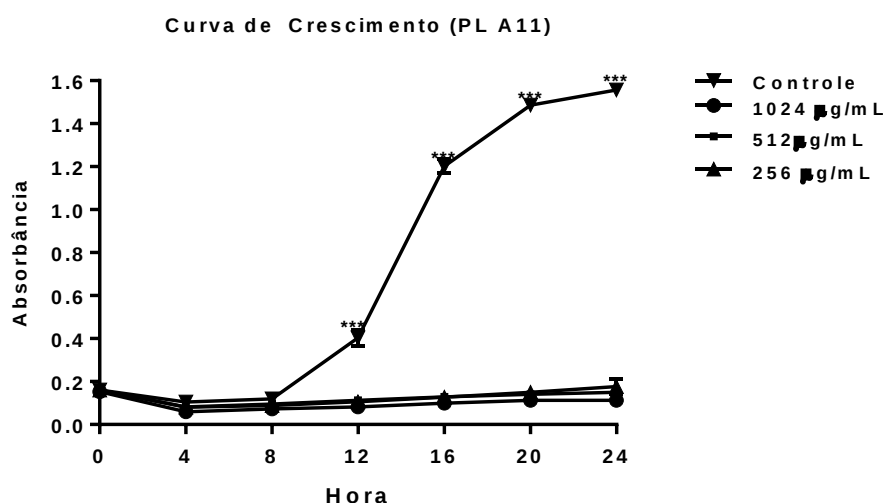
Figura 1. Curva de crescimento microbiana da cepa *C.albicans* 90028, sob ação do extrato etanólico de *A. crassiflora* Mart.



Fonte: Do autor. Fungos de *C. albicans* 990028 foram expostos a diferentes concentrações do extrato etanólico de *A. crassiflora* Mart. durante 24h a 35° C e a proliferação celular foi analisada em espectrofotômetro (530 nm). O gráfico representa média ± desvio padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicatas. One way ANOVA seguido de pós teste de Tukey. *** $P \leq 0,001$ em comparação ao controle.

A Figura 1 mostra a potência do extrato etanólico de *Annona crassiflora* Mart na diminuição do número de colônias de *C. albicans* ATCC 90028 após 0, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas. A partir de 12h de crescimento, o número de células viáveis de *C. albicans* ATCC 90028 foi significativamente reduzido em comparação ao controle não tratado quando os fungos foram expostos as concentrações de 1024 µg/mL e 512 µg/mL, sendo esta redução de 68,36 e 57,5%, respectivamente, quando comparado ao controle. Essa redução foi ainda maior para o tempo de 24h, onde observa-se uma redução do crescimento fúngico de 77%, 85% e 88% para as concentrações de 256 µg/mL 512 µg/mL e 1024 µg/mL, respectivamente, quando comparados ao controle (Figura 1).

Figura 2. Curva de crescimento microbiana da cepa *C. albicans* PL A11, sob ação do extrato etanólico de *A. crassiflora* Mart.



Fonte: Do autor. Fungos de *C. albicans* PL A11 foram expostos a diferentes concentrações do extrato etanólico de *A. crassiflora* Mart. durante 24h a 35° C e a proliferação celular foi analisada em espectrofotômetro (530 nm). O gráfico representa média $\pm$ desvio padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicatas. One way ANOVA seguido de pós teste de Tukey. *** $P \leq 0,001$ em comparação ao controle.

A Figura 2 mostra a potência do extrato etanólico de *A. crassiflora* Mart na diminuição do número de células de *C. albicans* PL A11 (isolado clínico) após 0, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas. O número de células viáveis de *C. albicans* PL A11 foi significativamente reduzido em comparação ao controle quando tratados com as três concentrações estudadas do extrato etanólico de *A. crassiflora* Mart a partir de 12h de tratamento ($P \leq 0,001$).

C. albicans PL A 11 tratada com extrato etanólico da *A. crassiflora* Mart demonstrou melhor atividade fungicida que a cepa de *C. albicans* ATCC 90028. É possível notar que no tempo de 24 horas houve uma redução do crescimento fúngico de 88%, 92% e 94% para as concentrações de 256 µg/mL 512 µg/mL e 1024 µg/mL, quando comparados ao controle, respectivamente (Figura 2).

Por ser um estudo inédito, não existe até o presente momento na literatura nenhum estudo para comparação, porém, alguns extratos de famílias diferentes plantas foram selecionadas para servir como base.

No extrato do rizoma e raiz de *Smilacina japonica* A. Gray foi confirmada a atividade fungicida contra fungos, através de estudos de curva de tempo. Este extrato apresentou um efeito fungicida potentes contra diferentes fungos, exceto *C. krusei*. Nas concentrações 208 µg/mL, 416 µg/mL e 832 µg/mL apresentou efeito fungicida contra *C. albicans* resultando em uma completa morte celular às 8 horas (LIU *et al.*, 2019).

Distintos resultados foram observados no crescimento das espécies de *Candida* spp. sobre o Extrato de Própolis (EP). A 450 µg/ml, para todas as espécies testadas, foi observado um ligeiro efeito inibitório até 12 h; entretanto, após esse período, as curvas resultantes eram quase idênticas às do controle. Na concentração de 900 µg/ml, foi observada uma redução substancial dependente do tempo no número de células viáveis em comparação com o grupo controle. Além disso, os resultados revelaram que o efeito do EP foi mais pronunciado nas espécies de *C. albicans* e *C. parapsilosis* (TOBALDINI-VALERIO *et al.*, 2016).

Para o EEAcM foi observado que a substância testada não é tempo dependente, ou seja, mesmo com o passar das horas (T0 a T24) o extrato permaneceu inibindo as colônias testadas sem grandes mudanças significativas ($P < 0,05$). Assim, pode-se sugerir que o presente extrato possui excelente atividade fungicida durante um satisfatório período de tempo.

As cepas testadas apresentaram crescimento satisfatório nas condições de controle positivo (sem exposição ao extrato ou antifúngico), assegurando a viabilidade das leveduras em condições normais. Não houve crescimento microbiano nas placas do controle de esterilidade.

2.3.3 Ação do extrato etanólico de *A. crassiflora* Mart na parede e membrana celular fúngica

2.3.3.1 Ensaio com sorbitol

Uma das formas de avaliar se uma nova droga atua na parede celular é por meio do ensaio com o sorbitol, um ensaio que compara a CIM da droga antifúngica na presença e na ausência do sorbitol (LETSCHER-BRU; HERBRECHT, 2003; PIERCE *et al.*, 2013; HAO *et al.*, 2013).

Diante da presença do sorbitol, um protetor osmótico que minimiza o efeito de agentes químicos sobre a parede celular fúngica, não se verificou aumento da concentração necessária para inibição do crescimento celular, ou seja, tanto para as cepas de *C. albicans* ATCC 90028 ou *C. albicans* PL A11, os valores da CIM na presença ou ausência de sorbitol permaneceram os mesmos: 512 µg/mL.

Para a caspofungina foram observados valores médios de CIM 0,25 µg/mL na ausência de sorbitol e 2 µg/mL na presença do sorbitol (0.8 M) sobre cepas de *C. albicans* ATCC e *C. albicans* isolados clínicos, respectivamente. Ressalta-se que é reconhecido o efeito da caspofungina por interferência na via de biossíntese da parede celular fúngica (SANTOS; VIEIRA, 2017).

Embora a estrutura básica da parede celular fúngica seja a mesma em todas as espécies (quitina e β -glicanos), cada fungo apresenta uma composição química diferente. Os genes que codificam a síntese de quitina e os sinais pelos quais são ativados dependem de específicas condições ambientais, estágio do ciclo celular e variam bastante entre as diversas espécies (SANTOS; VIEIRA, 2017).

Os ensaios de sorbitol realizados nesta pesquisa demonstraram que o EEAcM não exerce seu efeito antifúngico por meio da parede celular, pois os valores da CIM na presença e na ausência do sorbitol foram os mesmos (Tabela 2).

O controle positivo demonstrou que o ensaio foi realizado de forma satisfatória, pois na presença do sorbitol a CIM da caspofungina foi bem maior, do que na ausência (Tabela 2).

2.3.3.2 Interação com Ergosterol

Componente imprescindível para a manutenção da viabilidade fúngica, o próximo alvo farmacológico a ser estudado quanto ao mecanismo de ação da *Annona crassiflora* Mart foi à membrana plasmática.

Com relação ao ensaio para determinação da CIM na presença de ergosterol que atua fortemente nas vias de biossíntese da membrana celular foi verificado que também não existiu aumento da concentração necessária para inibição do crescimento celular. Tanto para as cepas de *C. albicans* ATCC 90028 ou *C. albicans* PL A11, os valores da CIM na presença ou ausência de sorbitol permaneceram os mesmos: 512 µg/mL.

Para a nistatina foram observados valores médios de CIM 7,5 µg/mL na ausência do ergosterol e 30 µg/mL na presença do ergosterol sobre cepas de *C. albicans* ATCC e *C. albicans* isolados clínicos, respectivamente. O efeito da nistatina é reconhecido pela interferência na membrana celular fúngica via ergosterol exógeno (MATHEW; NATH, 2009).

Com as características de estar presente nos fungos e ausente nas células humanas, além de ser importante na manutenção da membrana plasmática, ou seja, da viabilidade fúngica, o ergosterol torna-se um importante alvo farmacológico, especialmente para fármacos que interagem diretamente com este formando poros, a exemplo dos polienos (MINNEBRUGGEN et al., 2010).

Assim, os ensaios de ergosterol exógeno realizados neste estudo demonstraram que o EEAcM não exerce seu efeito antifúngico por meio da membrana celular fúngica, pois os valores da CIM na presença e na ausência do ergosterol exógeno foram os mesmos (Tabela 2).

O controle positivo demonstrou que o ensaio foi realizada de forma satisfatória, pois na presença do ergosterol exógeno a CIM da nistatina foi bem maior, do que na ausência (Tabela 2).

Diante desses resultados pode-se verificar que o extrato etanólico da *A. crassiflora* Mart tem atividade antifúngica, entretanto, falta definir por qual mecanismo de ação ocorre essa atividade. Dessa forma, necessita-se de mais ensaios para ser descoberto e verificado o mecanismo de ação deste extrato.

Tabela 2: Valores de CIM ($\mu\text{g} / \text{mL}$) dos medicamentos e extrato na ausência e presença de sorbitol (0,8M) e ergosterol (400 $\mu\text{g} / \text{mL}$) frente *C. albicans* ATCC 90028 e *C. albicans* PL A11.

Valores CIM $\mu\text{g}/\text{mL}$						
Microrganismos	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>C. albicans</i> PL A11	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>C. albicans</i> PL A11	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>C. albicans</i> PL A11
Medicamentos	Controle		+Sorbitol		+Ergosterol	
EXTRATO DAcm	512	512	512	512	512	512
Nistatina	7,5	7,5	-	-	120	120
Caspofungina	7,5	7,5	120	120	-	-

2.3.4 Avaliação do potencial hemolítico em eritrócitos humanos

A atividade hemolítica foi empregada para avaliar o potencial do extrato em causar lesões na membrana plasmática das células, pela formação de poros ou pela ruptura total, através da leitura óptica da hemoglobina liberada.

As plantas medicinais apresentam em sua composição princípios ativos responsáveis pelas propriedades terapêuticas a elas atribuídas. Apesar disso, reações adversas podem aparecer em decorrência de uso indevido ou contado direto com a mesma (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005).

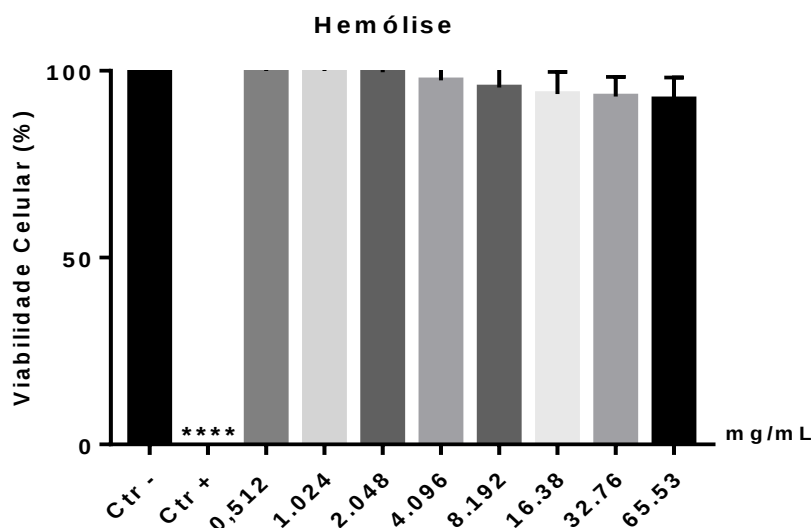
A realização deste teste torna-se necessário, pois a hemólise é caracterizada pela ruptura do eritrócito com liberação de hemoglobina e a hemoglobina livre no plasma é prejudicial à saúde causando sérios danos em órgãos vitais tais como fígado, rins e coração, sendo necessário dessa maneira a observação da referida atividade. Sendo assim, estes resultados se mostraram bastante significativos para a utilização desta planta que revelaram um potencial antioxidante significativo, como também atividade antifúngica promissora (DA SILVA, 2013; TRENTIN et al., 2015).

Em 2019, Silva e colaboradores avaliaram a citotoxicidade do extrato bruto *in vitro* da *Annona crassiflora* Mart sobre linhagens celulares de câncer de colo do útero imortalizadas. A triagem revelou que o extrato bruto apresentou menor atividade citotóxica em todas as células avaliadas quando comparadas à cisplatina.

Neste ensaio, o extrato nas concentrações de CIM a CIMx8 não promoveu danos à membrana plasmática dos eritrócitos, assim, ficou

demonstrado que em até concentrações de CIM x8 o EEAcM foi compatível com hemácias humanas (Figura 3). Dessa forma, por ser um estudo inédito há perspectivas para o seu uso com total segurança e prosseguimento de testes para uma futura aplicação no ser humano.

Figura 3. Efeito do extrato diclorometado de *A. crassiflora* Mart. sobre a viabilidade celular em eritrócitos humanos em 1 h de exposição.



Fonte: Do autor. Eritrócitos humanos com tipos sanguíneos A, B, AB e O foram incubados com diferentes concentrações do extrato etanólico de *A. crassiflora* Mart durante 1 h a temperatura ambiente e a hemólise foi analisada em espectrofotômetro (550 nm). O gráfico representa média $\pm$ desvio padrão da média de dois experimentos independentes realizados em triplicatas. One way ANOVA seguido de pós teste de Tukey. *** $P \leq 0,001$ em comparação aos controles.

2.3.5 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *A. crassiflora* Mart. sobre o biofilme

O crescimento em biofilme confere vantagens para os micro-organismos, as quais incluem resistência aos agentes antimicrobianos, virulência aumentada, proteção contra as defesas do hospedeiro, entre outras. Por isso, biofilme é o principal modo de crescimento de vários fungos que são micro-organismos oportunistas, como as leveduras do gênero *Candida*. Assim, essa forma de se organizar é o fator-chave para os micro-organismos sobreviverem em condições ambientais adversas (MELLO *et al.*, 2016).

Foi inserido o extrato etanólico *A. crassiflora* Mart no biofilme maduro (48 horas de formado) nas concentrações de 5mg/mL, 10mg/mL, 20mg/mL e

30mg/mL. Como antifúngico padrão, a nistatina foi utilizada nas concentrações que variaram entre 70µg/mL a 100µg/mL.

Comparando os resultados obtidos do extrato em relação ao controle, foi verificado que nas concentrações de 10mg/mL, 20mg/mL o biofilme foi reduzido de forma significativa ($P<0,05$) (Figura 4).

Ainda, pode-se verificar que a nistatina nas suas diversas concentrações comparando com o controle, reduziu o biofilme de forma eficiente e esperada como esperado (Figura 5).

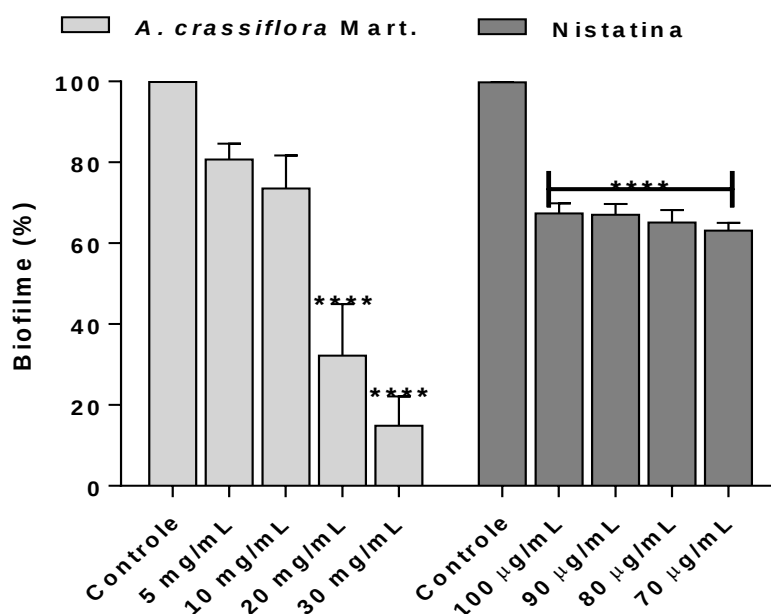
Até o presente momento não existem estudos do extrato etanólico de *A. crassiflora* Mart com relação a redução de biofilme, sendo este teste pioneiro. Com isso, existem estudos utilizando plantas medicinais com relevância da literatura que serão citados abaixo.

Para eficácia anti-biofilme, os óleos de citronela e canela reduziram significativamente o número de microrganismos viáveis e o acúmulo de biofilmes em T0. No entanto, no T48, não houve diferença entre biofilmes tratados e não tratados (DE ALMEIDA *et al.*, 2016).

O mel jujuba afeta os biofilmes, diminuindo o tamanho dos biofilmes maduros e interrompendo sua estrutura. A uma concentração de 40%, interfere na formação de biofilmes de *C. albicans* e interrompe os biofilmes estabelecidos. Os resultados indicaram que esse tipo de mel afetou a morfologia celular de *C. albicans* e diminuiu a espessura do biofilme (ANSARI *et al.*, 2013).

A antibioticoterapia prolongada, nutrição parenteral, quimioterapia e quebra das barreiras cutâneas da mucosa são determinantes importantes para o desenvolvimento desses biofilmes. Assim, é de grande importância a realização desse ensaio, pois infecções relacionadas a biofilmes de *Candida* spp., quando não tratadas corretamente, podem levar a infecções fúngicas invasivas e infecções na corrente sanguínea, com alto risco de mortalidade (LI, R. W.; SPERLING, 2013).

Figura 4. Porcentagem de biofilme de *C. albicans* tratados com diferentes concentrações do extrato diclometano da *A. crassiflora* Mart.e Nistatina.



Fonte: Do autor. Um biofilme maduro de 48 h de incubação a 35° C formado por quatro cepas de *C. albicans* (*C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* PL A10, *C. albicans* PL A11, *C. albicans* PL A15) foi tratado com o extrato etanólico de *A. crassiflora* nas de 30, 20, 10 e 5 mg/mL e com nistatina nas concentrações de 100, 90, 80 e 70 µg/mL em diferentes concentrações e foram analisadas em espectrofotômetro (600 nm). Os gráficos representam média $\pm$ desvio padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicatas. One way ANOVA seguido de pós teste de Tukey. *** $P \leq 0,001$ em comparação aos controles.

2.4 CONCLUSÃO

- O extrato etanólico de *Annona crassiflora* Mart Possui atividade antifúngica;
- Com relação ao mecanismo de ação, falta definir por qual mecanismo de ação ocorre essa atividade;
- Tem a capacidade de inibir as cepas durante as 24 horas testadas e não é tempo-dependente;
- O extrato promove redução do crescimento do biofilme multiespécies de fungos de *Candida albicans*;
- O extrato não é citotóxico para células sanguíneas eritrócitos.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O extrato etanólico de *Annona crassiflora* Mart apresentou atividade fungicida, de interesse terapêutico frente cepas ATCC e isolados clínicos de *C. Albicans*. Entretanto, falta definir por qual mecanismo de ação ocorre essa atividade. Ainda, o extrato foi capaz de inibir o crescimento das cepas durante as primeiras 24 horas testadas, sem ser tempo-dependente.

Com relação ao controle de biofilmes, o extrato promoveu redução do crescimento do biofilme de *C. albicans*. A citocompatibilidade foi observada em eritrócitos humanos de sangue periférico. Outros ensaios deverão ser realizados, a exemplo de estudos toxicológicos e ensaios clínicos, para estabelecer eficácia e segurança terapêutica de formulações contendo o extrato.

Os resultados desta pesquisa apontam para potencialidade do extrato diclometano de *A. crassiflora* Mart no tratamento de infecções ocasionadas por *C. albicans*.

REFERÊNCIAS

- ALBERNAZ, Lorena Carneiro et al. Investigation of plant extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 131, n. 1, p. 116–121, 2010.
- ALMEIDA, Leopoldina de Fátima Dantas De et al. Efficacy of citronella and cinnamon essential oils on *Candida albicans* biofilms. **Acta Odontologica Scandinavica**, [s. l.], v. 74, n. 5, p. 393–398, 2016.
- ANDRADE, Milene Aparecida et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, [s. l.], v. 43, n. 2, p. 399–408, 2012.
- ANSARI, Mohammad Javed et al. Effect of Jujube Honey on *Candida albicans* Growth and Biofilm Formation. **Archives of Medical Research**, [s. l.], v. 44, n. 5, p. 352–360, 2013.
- BAGINSKI, M.; CZUB, J. Amphotericin B and Its New Derivatives – Mode of Action. **Current Drug Metabolism**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 459–469, 2009.
- BAYDAR, Hasan et al. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 169–172, 2004.
- BENNETT, J. Agentes antimicrobianos, agentes antifúngicos. Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. 11a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, p.1103 – 1117, 2007.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade Brasileira**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>> Acesso em: 15 outubro 2018.
- BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. **Fármacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Santos, 416 p. 2010.
- BRUNI, Renato et al. Chemical composition and biological activities of *Ischpingo* essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 85, n. 3, p. 415–421, 2004.
- CARVALHO et al. Efeito da bomba de infusão de soluções sobre os graus de hemólise em concentrados de hemácias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. V.29, n. 2. 149-152, 2007.
- CLERYA, Maria et al. Evaluation of Antifungal Activity and Mechanism of Action of Citral against *Candida albicans*. [s. l.], v. 2014, 2014.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**: approved standard. 2nd ed. Wayne. xviii, 30 p. M27-A2, v. 22, n. 15, 2012.
- COSTA, Emmanoel Vilaça et al. Antioxidant and antimicrobial activities of aporphinoids and other alkaloids from the bark of *Annona salzmannii* A. DC. (Annonaceae). **Natural Product Research**, [s. l.], v. 27, n. 11, p. 1002–1006, 2013.
- DJORDJEVIC, D. et al. Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. [s. l.], v. 68, n. 6, 2002.
- DA SILVA, L.C.N.; SILVA-JÚNIOR, C.A.; SOUZA, R.M.; MACEDO, A.J.; SILVA, M.V.; CORREIA, M.T.S. Comparative analysis of the antioxidant and DNA

protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. **Food and Chemical Toxicology**, 49, 2222–2228, 2011.

DRAGANO, Nathalia Romanelli Vicente et al. Influence of Marolo (*Annona crassiflora* Mart.) Pulp Intake on the Modulation of Mutagenic/Antimutagenic Processes and Its Action on Oxidative Stress In Vivo. **Plant Foods for Human Nutrition**, [s. l.], v. 65, n. 4, p. 319–325, 2010.

EGYDIO, Anary Priscila M.; VALVASSOURA, Thaís A.; SANTOS, Déborah Yara A. C. Geographical variation of isoquinoline alkaloids of *Annona crassiflora* Mart. from cerrado, Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, [s. l.], v. 46, p. 145–151, 2013.

ELLEPOLA, Arjuna N. B.; SAMARANAYAKE, Lakshman P. Impact of Brief and Sequential Exposure to Nystatin on the Germ Tube Formation and Cell Surface Hydrophobicity of Oral *Candida Albicans* Isolates from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients. **Medical Principles and Practice**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 307–312, 2014.

FORMAGIO, A. S. N. et al. In vitro biological screening of the anticholinesterase and antiproliferative activities of medicinal plants belonging to Annonaceae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s. l.], v. 48, n. 4, p. 308–315, 2015.

FRANCO, Bernadette D. G. M.; CORRÊA, Benedito. Brazilian Journal of Microbiology: Editorial. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 304–309, 2000.

FREIRE, Julliana Cariry Palhano et al. Atividade antifúngica de fitoterápicos sobre espécies de *Candida*: uma revisão de literatura. **ARCHIVES OF HEALTH INVESTIGATION**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 307–310, 2016.

FREIRES, Irlan De Almeida et al. *Coriandrum sativum* L. (Coriander) Essential Oil: Antifungal Activity and Mode of Action on *Candida* spp., and Molecular Targets Affected in Human Whole-Genome Expression. [s. l.], v. 9, n. 6, 2014.

FROST, David J. et al. barrier, prevents osmotic bursting from protoplast turgor. [s. l.], p. 306–310, 1995.

GABE, Cristina; ALMEIDA, Denise R.; SIQUEIRA, Luciano O. Avaliação de eventos infecciosos oportunistas em crianças portadoras de leucemias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 74–79, 2009.

GIACOMAZZI, Juliana et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 145–150, 2016.

GIOLO, Muriel Padovani; SVIDZINSKI, Terezinha Inez Estivalet. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 225–234, 2010.

HAO, Binghua et al. Caspofungin Kills *Candida albicans* by Causing both Cellular Apoptosis and Necrosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 326–332, 2013.

HIDALGO, E. M. P. **Atividades biológicas dos alcaloides de *Annona crassiflora* Mart.** 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

HÖFLING, JF. et al. Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. **Brazilian Journal of Biology**, [s. l.], v. 70, n. 4, p. 1065–1068, 2010.

HOUGHTON, P. J. et al. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: Visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 110, n. 3, p. 391–400, 2007.

- HUANG, Guanghua. Regulation of phenotypic transitions in the fungal pathogen *Candida albicans*. **Virulence**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 251–261, 2012.
- JUSTINO, Allisson B. et al. Peel of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of antioxidant compounds with α -amylase, α -glucosidase and glycation inhibitory activities. **Bioorganic Chemistry**, [s. l.], v. 69, p. 167–182, 2016.
- KAMIMURA, Helayne; CALDEIRA, Sílvia; AVILA, Marla. Incidência de infecções fúngicas em pacientes cirúrgicos: uma abordagem retrospectiva. **Currículo Lattes**, [s. l.], p. 49–58, 2013.
- KLEPSE, Michael E. et al. Influence of Test Conditions on Antifungal Time-Kill Curve Results: Proposal for Standardized Methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 42, n. 5, p. 1207–1212, 1998.
- LAGE, Gisele Avelar et al. The first report on flavonoid isolation from *Annona crassiflora* Mart. **Natural Product Research**, [s. l.], v. 28, n. 11, p. 808–811, 2014.
- LETSCHER-BRU, V. Caspofungin: the first representative of a new antifungal class. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 51, n. 3, p. 513–521, 2003.
- LI, R. W.; SPERLING, A. K. Drug Resistance. **Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition**, [s. l.], p. 418–420, 2013.
- LI, Xiaoxu et al. Oropharyngeal *Candida* colonization in human immunodeficiency virus infected patients. **Apmis**, [s. l.], v. 121, n. 5, p. 375–402, 2013.
- LIU, Wei et al. Antifungal Activity of Crude Extract from the Rhizome and Root of *Smilacina japonica* A. Gray. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 2019, p. 1–9, 2019.
- MACHADO, Alan et al. Nematicidal activity of *Annona crassiflora* leaf extract on *Caenorhabditis elegans*. **Parasites & Vectors**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 113, 2015.
- MATHEW, Bijoy P.; NATH, Mahendra. Recent Approaches to Antifungal Therapy for Invasive Mycoses. **ChemMedChem**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 310–323, 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/cmdc.200800353>>
- MELLO, Thaís P. et al. Assessment of biofilm formation by *Scedosporium apiospermum*, *S. aurantiacum*, *S. minutisporum* and *Lomentospora prolificans*. **Biofouling**, [s. l.], v. 32, n. 7, p. 737–749, 2016.
- MINNEBRUGGEN, G. V.; FRANÇOIS, I. E. J. A.; CAMMUE, B. P. A.; THEVISSSEN, K.; VROOME, V.; BORGERS, M.; SHROOT, B. A General Overview on Past, Present and Future Antimycotics. **The Open Mycology Journal**, v. 4, p. 22–32, 2010.
- MODRZEWSKA, Barbara; KURNATOWSKI, Piotr. Review articles Selected pathogenic characteristics of fungi from the genus. **Annals of Parasitology**, [s. l.], v. 59, n. 502, p. 57–66, 2013.
- MONTEIRO, Larissa Cavalcanti; CAROLINA, Ana; DULGHEROFF, Bernardes. e sua susceptibilidade à nistatina e à anfotericina B. [s. l.], p. 1–9, 2019.
- NCCLS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. National Committee for Clinical Laboratories Standards. Document M27-A2. 2012.
- ODDS, Frank C.; BROWN, Alistair J. P.; GOW, Neil A. R. Antifungal agents: Mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 272–279, 2003.
- PIERCE, Christopher G. et al. ScienceDirect Antifungal therapy with an emphasis on biofilms. [s. l.], p. 726–730, 2013.
- PIMENTA, Lúcia Pinheiro Santos et al. In vivo antimalarial efficacy of acetogenins, alkaloids and flavonoids enriched fractions from *Annona crassiflora* Mart. **Natural**

Product Research, [s. l.], v. 28, n. 16, p. 1254–1259, 2014.

RODRIGUES, Klinger Antonio Da Franca et al. 2-Amino-thiophene derivatives present antileishmanial activity mediated by apoptosis and immunomodulation in vitro. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 106, p. 1–14, 2015.

ROESLER, Roberta et al. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 104, n. 3, p. 1048–1054, 2007.

ROESLER, Roberta. Effect of extracts from araticum (*Annona crassiflora*) on CCl₄-induced liver damage in rats. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 93–100, 2011.

SANGUINETTI, Maurizio; POSTERARO, Brunella; LASS-FLÖRL, Cornelia. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, [s. l.], v. 58, n. S2, p. 2–13, 2015.

SANTOS, J. I.; VIEIRA, A. J. H. Brazilian Journal of Clinical Analyses. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, [s. l.], v. 49, n. 3, p. 235–239, 2017.

SARTORATTO, Adilson et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 275–280, 2004.

SIDDIQUI, Z. N. et al. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 237 – 243, 2013.

SILVA, Viviane A. O. et al. Hexane partition from *Annona crassiflora* Mart. promotes cytotoxicity and apoptosis on human cervical cancer cell lines. **Investigational New Drugs**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 602–615, 2019.

SOBCZYNSKI, J.; CHUDZIK-RZAD, B. Organic Nanocarriers for the Delivery of Antiinfective Agents. In: **Nanostructures for Antimicrobial Therapy: Nanostructures in Therapeutic Medicine Series**. Medical University of Lublin, Lublin, Poland: Elsevier, 2017. p. 369–393.

TAYLOR, Publisher; LIMA, Igara Oliveira; PEREIRA, Fillipe De Oliveira. Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. [s. l.], n. October, p. 37–41, 2013.

TOBALDINI-VALERIO, Flávia K. et al. Propolis: a potential natural product to fight *Candida* species infections. **Future Microbiology**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 1035–1046, 2016.

TRENTIN, D.S., Silva, D.B., Frasson, A.P., Rzhhepishchevska, O., Da Silva M.V., Pulcini, E. De L., James, G., Soares, G.V., Tasca, T., Ramstedt, M., Giordani, R.B., Lopes, N.P., Macedo, A.J. Natural Green coating inhibits adhesion of clinically important bacteria. **Sci Rep**. 5, 1-10, 2015

VEIGA JUNIOR, Valdir F.; PINTO, Angelo C.; MACIEL, Maria Aparecida M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005.

VILAR, JB. et al. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**, [s. l.], v. 68, n. 1, p. 141–147, 2008.

WEBSTER, Duncan et al. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 115, n. 1, p. 140–146, 2008.

YAPAR, Nur. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 95, 2014.

ANEXOS

Quadro 1- Resultados da média da CIM ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos de plantas do cerrado brasileiro frente às cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, técnica de microdiluição.

EXTRATOS TESTADOS	Microrganismos			
	<i>C. albicans</i> ATCC - 76615	<i>C. albicans</i> ATCC -	<i>C. tropicalis</i> ATCC - 3803	<i>C. krusei</i> ATCC - 6258
JA1	>2048	>2048	>2048	>2048
JA2	>2048	>2048	>2048	>2048
JA3	>2048	>2048	>2048	>2048
JA4	>2048	>2048	>2048	>2048
JA5	>2048	>2048	>2048	>2048
JA6	>2048	>2048	>2048	>2048
JAD	>2048	>2048	>2048	>2048
JJ1	>2048	>2048	>2048	>2048
JJ2	>2048	>2048	>2048	>2048
JJ3	>2048	>2048	>2048	>2048
JJ4	>2048	>2048	>2048	>2048
JJ5	>2048	>2048	>2048	>2048
JJ6	>2048	>2048	>2048	>2048
JJET	>2048	>2048	>2048	>2048
JJAQ	>2048	>2048	>2048	>2048
JFD	>2048	>2048	>2048	>2048
JH	MI	MI	MI	MI

JA	>2048	>2048	>2048	>2048
HH2O	MI	MI	MI	MI
JD	MI	MI	MI	MI
JN	>2048	>2048	>2048	>2048
3D	>2048	>2048	>2048	>2048
3N-N	>2048	>2048	>2048	>2048
BA	>2048	>2048	>2048	>2048
BH2O	>2048	>2048	>2048	>2048
PA H2O	>2048	>2048	>2048	>2048
PAN	>2048	>2048	>2048	>2048
PAA	>2048	>2048	>2048	>2048
PAB	>2048	>2048	>2048	>2048
PAH	>2048	>2048	>2048	>2048
PAD	>2048	>2048	>2048	>2048
PR H2O	>2048	>2048	>2048	>2048
PRN	>2048	>2048	>2048	>2048
PRA	>2048	>2048	>2048	>2048
PRB	>2048	>2048	>2048	>2048
PRH	>2048	>2048	>2048	>2048
PRD	>2048	>2048	>2048	>2048
EB	>2048	>2048	>2048	>2048
FD	256	256	256	256
FAE	>2048	>2048	>2048	>2048
FBu	>2048	>2048	>2048	>2048
Cepa fúngica	+	+	+	+
Esterilidade	-	-	-	-