

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
BACHARELADO EM ODONTOLOGIA

JOSÉ LUCAS SOARES FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS ETANÓLICO E
AQUOSO DE *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (*Lamiaceae*)**

PATOS-PB

2019

JOSÉ LUCAS SOARES FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS ETANÓLICO E
AQUOSO DE *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (*Lamiaceae*)**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado à Coordenação do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho.

PATOS-PB

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSRT DA UFCG

F383a Ferreira, José Lucas Soares
Avaliação da atividade antifúngica dos extratos etanólico e aquoso de
Rhaphiodon echinus ness. mart. Schauer (*Lamiaceae*) / José Lucas Soares
Ferreira. – Patos, 2019.
50f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Odontologia) – Universidade Federal
de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2019.

“Orientação: Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho”.

Referências.

1. Plantas Medicais. 2. Microbiologia. 3. Candidíase oral.
- I. Título.

CDU 616.314:633.88

JOSÉ LUCAS SOARES FERREIRA

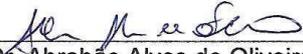
**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS ETANÓLICO E
AQUOSO DE *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (*Lamiaceae*)**

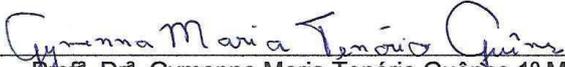
Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado à Coordenação do Curso
de Odontologia da Universidade Federal
de Campina Grande – UFCG, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Bacharel em Odontologia.

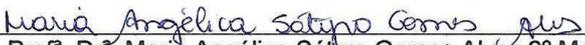
Orientador: Prof. Dr. Abrahão Alves de
Oliveira Filho.

Aprovado em 14/05/2019

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho – Orientador
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG


Prof. Dr. Gymenna Maria Tenório Guênes 1º Membro
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG


Prof. Dr. Maria Angélica Sátiro Gomes 2º Membro
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG

AGRADECIMENTOS

A Deus rendo graças pelo dom da vida, pois segundo a vontade D'Ele, mais um sonho se realiza; a O que tudo pode, eu agradeço.

À minha mãe Suênia, sou eternamente grato, pois sem seus cuidados, conselhos, sem suas renúncias em amor de nossa família, sem seu amor, eu não conquistaria tanto. Sua vida não foi fácil, mas nunca esqueça que eu sempre estarei ao seu lado. Este ano, me torno cirurgião-dentista por mim e por você.

Ao meu pai Sérgio, agradeço por todo o apoio e segurança, sem seu alento e cuidado, nada disso seria possível; graças ao suor do seu trabalho, pelas noites mal dormidas, em risco de vida; por seu empenho, eu agradeço.

Ao meu irmão Pedro, agradeço por toda paciência, cumplicidade e amizade. Agradeço a Deus por ter você como irmão e melhor amigo.

Aos meus amigos Emanuelle, Sandrielly, Aparecida, Vinicius, Isadora e Elza agradeço pelos momentos felizes que compartilhamos; agradeço também por ter vocês ao meu lado nos momentos difíceis; obrigado por me acolher e cuidar; como uma família, vocês foram meu suporte emocional durante esses anos; Sou eternamente agradecido a Deus por ter feito amigos tão especiais; juntos, vencemos cada dia desses cinco anos.

À minha dupla, José Henrique, agradeço por toda cumplicidade, confiança, amizade e irmandade durante todos esses anos; Obrigado por sempre ser tão atencioso, humilde e prestativo; Deus abençoou minha vida com sua amizade.

Agradeço as minhas parceiras de pesquisa, Daniele e Joyce por todos os bons momentos que compartilhamos e a amizade que construímos.

Agradeço ao meu Orientador, Dr. Abrahão Alves, por compartilhar todo seu conhecimento e experiência; pela oportunidade de participar do grupo de pesquisa LAFBIM e por todos os conselhos e princípios que me ensinou; sou grato pela confiança, paciência e amizade.

Agradeço a todos os demais professores, em especial ao Dr. Julierme Rocha, pela oportunidade de participar da Liga Acadêmica de Cirurgia, por compartilhar toda experiência e paixão pela cirurgia, especialidade que tanto gosto.

Agradeço às professoras, Dr^a. Gymenna e Dr^a Angélica, por participarem da banca examinadora, e por todos os ensinamentos no decorrer do curso.

Por fim, agradeço a todos os que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste sonho.

“Porque o Senhor dá a sabedoria; da sua boca é que vem o conhecimento e o entendimento”.

Provérbios 2:6

FERREIRA, J.L.S. **Avaliação da atividade antifúngica dos extratos etanólico e aquoso de *Rhaphiodon echinus* ness mart. Schauer (*Lamiaceae*)**. Patos, Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, 2019, 50p.

RESUMO

Candidíase 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 uso excessivo e indiscriminado de fármacos propicia o surgimento de leveduras resistentes. Assim, com a necessidade do desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas de maior eficácia, surge a utilização de fitoterápicos a base de plantas medicinais como tratamento alternativo. Desta forma, o presente trabalho objetivou analisar a atividade antifúngica dos extratos etanólico e aquoso de *Rhaphiodon echinus* sobre cepas de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*. Para realização dos testes, foi utilizada a metodologia da Concentração Inibitória Mínima (CIM), por meio de ensaios *in vitro* pela técnica de microdiluição em caldo. Para a realização da técnica, em uma placa de 96 orifícios, foi adicionado o Caldo Sabouraud Dextrose (CSD), um dos extratos de *R. echinus* nas diferentes concentrações e o inóculo do gênero *Candida*. As placas foram incubadas a 37°C durante 24-48 horas para a leitura da CIM. Utilizou-se como controle positivo o antifúngico nistatina. Como resultados observou-se que a CIM₅₀ do extrato aquoso de *R. echinus* contra as cepas de *C. albicans* e *C. krusei* foi de 256 µg/mL. Contra as cepas de *C. tropicalis*, a CIM₅₀ foi de 512 µg/mL. A CIM₅₀ do extrato etanólico de *R. echinus* contra as cepas de *C. albicans* foi de 256 µg/mL, e contra as cepas de *C. tropicalis* e *C. krusei* a CIM₅₀ foi de 512 µg/mL. Conclui-se que os extratos de *R. echinus* são eficazes contra as cepas de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, entretanto mais estudos são necessários para desvendar o mecanismo de ação da atividade antifúngica destes produtos naturais.

Palavras-chave: Plantas medicinais, Microbiologia, Candidíase oral.

ABSTRACT

Candidiasis is a mycosis caused by yeasts of the genus *Candida*, in which the lesion may be mild, acute or chronic, superficial or deep, and of a very variable clinical spectrum. The excessive and indiscriminate use of drugs leads to the emergence of resistant yeasts. Thus, with the need for the development of new therapeutic alternatives of greater efficacy, the use of herbal phytotherapies appears as an alternative treatment. The present work aimed to analyze the antifungal activity of ethanolic and aqueous extracts of *Rhaphiodon echinus* on strains of *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida krusei*. To perform the tests, the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) methodology was used, through in vitro assays by broth microdilution technique. To perform the technique, a Sabouraud Dextrose Broth (SDB), one of the extracts of *R. echinus* at different concentrations and the inoculum of the genus *Candida*, was added to a 96-well plate. Plates were incubated at 37 ° C for 24-48 hours for MIC reading. The anti-fungal nystatin was used as a positive control. As results it was observed that MIC50 of the aqueous extract of *R. echinus* against the strains of *C. albicans* and *C. krusei* was 256 µg / mL. Against the strains of *C. tropicalis*, MIC50 was 512 µg / mL. The MIC50 of the ethanolic extract of *R. echinus* against the strains of *C. albicans* was 256 µg / mL, and against the strains of *C. tropicalis* and *C. krusei* the MIC50 was 512 µg / mL. It is concluded that the extracts of *R. echinus* are effective against the strains of *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis*, however more studies are necessary to uncover the mechanism of action of the antifungal activity of these natural products.

Keywords: Medicinal Plants, Microbiology, Oral Candidiasis.

LISTA DE TABELAS

Artigo submetido e publicado no International Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Research

TABELA 1 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL do extrato aquoso de *Rhaphiodon echinus* contra cepas de *Candida krusei*. 22

TABELA 2 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL do extrato etanólico de *Rhaphiodon echinus* contra cepas de *Candida krusei*. 23

Artigo submetido na Revista UNINGÁ

TABELA 1 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL do extrato aquoso de *Rhaphiodon echinus* contra cepas de *Candida albicans*. 32

TABELA 2 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL do extrato etanólico de *Rhaphiodon echinus* contra cepas de *Candida albicans*. 32

Artigo submetido na Revista da UNINCOR

TABELA 1 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL do extrato aquoso de *Rhaphiodon echinus* contra cepas de *Candida tropicalis*. 41

TABELA 2 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL do extrato etanólico de *Rhaphiodon echinus* contra cepas de *Candida tropicalis*. 41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IJPPR	International Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Research
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIM ₅₀	Concentração Inibitória Mínima 50%
CSD	Caldo Sabouraud Dextrose
DMSO	Dimetilsulfóxido
mL	Mililitros
<i>R. echinus</i>	<i>Rhaphiodon echinus</i>
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
µg	Microgramas
UNINCOR	Universidade Vale do Rio Verde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	12
3. REFERÊNCIAS.....	15
4. ARTIGOS	18
4.1 Artigo submetido e publicado no IJPPR	18
4.2 Artigo submetido na Revista UNINGÁ	26
4.3 Artigo submetido na Revista da UNINCOR	36
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
ANEXOS	46

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Candida* é composto por fungos leveduriformes hialinos, com formação de blastoconídios, pseudo-hifas e, ocasionalmente, hifas verdadeiras. Macroscopicamente, em culturas de ágar Sabouraud destrose, as colônias são geralmente de cor creme ou esbranquiçada e a textura pode ser lisa ou enrugada, brilhante ou seca (LACAZ et al., 2002; SILVA et al., 2012).

As principais espécies de leveduras do gênero *Candida* de interesse clínico causadoras de candidíase, em especial a oral, são: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei* (COLOMBO et al., 2007; KOTHAVADE et al., 2010; RIBEIRO et al., 2010).

A candidíase ou candidose 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 (FREIRE et al., 2016).

Em relação ao tratamento da candidíase oral, grande quantidade de fármacos obtidos por meio da síntese orgânica tem sido utilizada no tratamento de infecções micóticas, como os antissépticos à base de tintura de iodo, violeta de genciana, ácido salicílico e benzoico, derivados sulfamídicos, corantes, quinonas e antifúngicos poliênicos (nistatina, anfotericina). Além desses, utilizam-se também antifúngicos como os azóis (cetoconazol, econazol, sulconazol, miconazol, clotrimazol e fluconazol) e anfotericina B. Porém, as infecções fúngicas são de difícil tratamento, fato relacionado à elevada resistência da *Candida* frente à ação de alguns antifúngicos convencionais (ARAÚJO et al., 2004; VANDEPUTTE et al., 2012).

O uso excessivo e indiscriminado destes fármacos propicia o surgimento de leveduras resistentes, principalmente em pacientes imunossuprimidos, susceptíveis a infecções frequentes. Assim, há necessidade do desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas de maior eficácia, dentre as possibilidades, surge a utilização de fitoterápicos a base de plantas medicinais 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).

Desta forma, as plantas medicinais constituem uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos e são amplamente estudadas a fim de

encontrar compostos mais eficazes e menos tóxicos (NAKAMURA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2006; PRABUSEENIVASAN et al., 2006).

Espécies vegetais brasileiras são usualmente utilizadas como antifúngicos e é notório que o Brasil, devido à sua diversidade vegetal, é um país conhecido mundialmente pela variedade de produtos com ação medicinal, largamente utilizados em suas diversas regiões (BOTELHO et al., 2007).

Um exemplo de espécie vegetal presente no Nordeste brasileiro e relatada na literatura científica com relação as suas propriedades farmacológicas é a planta *Rhaphiodon echinus*, uma planta brasileira, pertencente a família *Lamiaceae* e conhecida popularmente como “Betônica” e “flor-de-urubu”. Na medicina popular, suas folhas são utilizadas para diversos fins terapêuticos como por exemplo: tratamento da tosse, inflamação na cavidade oral e infecções no trato genitourinário (ALBUQUERQUE et al., 2007; MENEZES et al., 2006).

Desta forma, com base nas informações sobre o potencial terapêutico das plantas medicinais e a importância do combate as infecções causadas por leveduras do gênero *Candida*, o presente trabalho avaliou a atividade antifúngica dos extratos aquoso e etanólico de *R. echinus* Ness Mart. Schauer (*Lamiaceae*) contra cepas de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A microbiota residente da boca é bastante diversificada, com mais de 700 espécies de micro-organismos identificadas, das quais muitas ainda não foram formalmente descritas. Nessa vasta e complexa ecologia microbiana da cavidade bucal humana, encontram-se, pelo menos, vinte gêneros e, aproximadamente, noventa espécies de leveduras isoladas e classificadas; dentre estas, oito espécies do gênero *Candida* foram consideradas patogênicas oportunistas causadoras de candidíase oral: *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida viswanathii* e *Candida glabrata* (YUHONG et al., 2015).

A Candidíase é uma infecção humana de natureza fúngica que tornou-se preocupante devido à sua frequência e gravidade das suas complicações em pacientes imunocomprometidos (RUKAYADI et al., 2011). Quando essa infecção é encontrada na mucosa bucal é chamada de candidíase bucal e quando acomete a área do palato em usuários de prótese pode estar associada à estomatite protética (PEREIRA-CENCI, 2008).

Numerosos fatores contribuem para as infecções fúngicas pelo gênero *Candida*, dentre os quais podemos destacar: o rompimento das barreiras cutânea e mucosa, disfunção dos neutrófilos, defeito na imunidade mediada por células, desordem metabólica, exposição direta aos fungos, extremos de idade (recém-nascidos e idosos), desnutrição aguda, longo tratamento com antibióticos, quimioterapia, transplantes, resistência a antifúngicos, dentre outros (PFALLER; DIEKEMA, 2007).

Os principais agentes antifúngicos utilizados para o tratamento da candidíase são os azóis e polienos. Os azóis, como cetoconazol, miconazol, clotrimazol, fluconazol e itraconazol, interagem com a citocromo P-450-dependente 14- α -desmetilase, e como resultado inibem a síntese de ergosterol da membrana. Já os polienos (nistatina e anfotericina B) atuam ligando-se a esteróis na membrana celular e formando canais, permitindo que os íons de K⁺ e Mg⁺⁺ saiam da célula (WISPELWEY, PARSONS, 2006). Algumas drogas, como a anfotericina B, são muito tóxicas, e outras, como fluconazol, são limitadas por causa da alta taxa de resistência (SANGLARD, ODDS, 2002; WHITE, MARR, BOWDEN, 1998).

Entretanto, o uso difundido e não controlado de tais fármacos podem induzir ao surgimento de cepas com resistência medicamentosa (STANISZEWSKA;

BONDARYK; OCHAL, 2015). Desta forma, a busca por novas substâncias capazes de controlar e debelar a infecção tem sido avaliada. Dentre estas, destaca-se a investigação acerca do uso de produtos naturais de origem vegetal, geralmente óleos essenciais ou extratos de plantas (OLIVEIRA et al., 2014; TRINDADE et al., 2015).

Os produtos naturais constituem uma fonte privilegiada e insubstituível de compostos químicos com várias funções terapêuticas. Inúmeros compostos derivados de plantas medicinais têm sido utilizados como protótipos para a síntese de novos fármacos antimicrobianos menos tóxicos e mais eficazes. Isso se deve às características únicas das moléculas antimicrobianas naturais, ou seja, a sua imensa diversidade molecular, permeabilidade celular intrínseca, e especificidade bioativa (BARBOSA-FILHO et al., 2007; BARREIRO, FRAGA, ARAÚJO Jr, 2004; JIANG et al., 2008; NISBET; MOORE, 1997; NEWMAN, CRAGG, 2012; USTULIN et al., 2009).

Desta forma, moléculas isoladas destes produtos naturais de origem vegetal com potencial antifúngico podem contribuir para a indústria farmacêutica no desenvolvimento de fármacos e para a produção de novas formulações, com menos efeitos colaterais, amplo espectro de ação e menor custo (ARANGO; BUENO-SANCHEZ; BETANCUR-GALVIS, 2004).

O Brasil é o país com a maior biodiversidade de plantas do mundo. Possui mais de 55 mil espécies descritas de diferentes famílias, o que corresponde a 22% do total mundial. A grande biodiversidade de espécies vegetais presentes no Brasil constitui uma de suas maiores riquezas e se destaca como fonte para obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica (CARVALHO et al., 2007).

Uma família que está presente em todas as regiões do Brasil é a *Lamiaceae*, que compreende cerca de 7000 espécies de plantas e que na sua maioria são produtoras de óleos essenciais (FALCÃO et al., 2003). Dentre estas espécies desta família pode-se destacar a *Raphiodon echinus*, que é comum no leste do Brasil e típica da "caatinga" (vegetação semi-árida). É uma erva com folhas aromáticas com flores roxas brilhantes, encontrada nos estados da Bahia, Pernambuco, Paraíba, Ceará e Minas Gerais (ALBUQUERQUE et al., 2007).

Em um estudo fitoquímico, Menezes e Kaplan (2006) identificaram a presença de triterpenos pentacíclicos ácidos presentes no óleo essencial de *Raphiodon*

echinus, tais como o ácido betulínico, ácido oleanólico, ácido usólico, ácido mircomérico e ácido siaresinólico.

A infusão das folhas de *Raphiodon echinus* é utilizada na medicina popular brasileira para o tratamento de inflamação, tosses e doenças infecciosas. Estudos laboratoriais têm mostrado que produtos vegetais de *Raphiodon echinus* já apresentaram efeitos antibacterianos (SOUZA; RODRIGUES, 2012), anti-inflamatórios e analgésicos (ALBUQUERQUE et al., 2007). No entanto, poucos estudos de atividade antifúngica foram realizados com os extratos etanólico e aquoso das folhas de *Raphiodon echinus*.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, M. F.; MELO J. G.; DOS SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **J. Ethnopharmacol.**, v. 114, p. 325–354, 2007.
- ANDRADE, M.A.; CARDOSO, M.G.; BATISTA, L.R.; MALLET, A.C.T.; MACHADO, S.M.F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Rev. Ciênc. Agron.**, v.43, n.2, p.399-408, 2012.
- ARANGO, A.C.M.; BUENO-SÁNCHEZ, J.G.; BETANCUR-GALVIS, L.A. Productos naturales con actividad antimicótica. **Rev Esp. Quimioterap.**, v.17, n.4, p 31-325, 2004.
- ARAÚJO, J.C.L.V.; LIMA, E.O.; CEBALLOS, B.S.O.; FREIRE, K.R.L.; SOUZA, E.L.; SANTOS FILHO, L. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microorganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Rev. Patol. Trop.**, v. 33, p. 55-64, 2004.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; NASCIMENTO-JÚNIOR, F. A.; TOMAZ, A. C. A; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; SOUZA, M. F. V.; BATISTA, L. M.; DINIZ, M. F. F. M. Natural products with antileprotic activity. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, n.1, p. 141-148, 2007.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; ARAÚJO Jr, J. X. O uso de produtos naturais vegetais como matérias primas vegetais para a síntese e planejamento de fármacos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. da UFSC, 2004. Cap. 8, p. 147 – 210.
- BOTELHO, M. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; BASTOS G.M.; FONSECA S. G. C.; LEMOS T. L. G.; MATOS, F.J. A.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V.S.; BRITO, G.A.C. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.40, n.3, p.349-56,2007.
- CARVALHO, A. C. B.; NUNES, D. S. G.; BARATELLI, T. G.; SHUQAIR, N. S. M. S. A.; NETTO, E. M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazon.**, v. 5, n.11, p.26-32, 2007.
- COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L. R. B. F.; MONFARDINI, L. P. D. A.; CUNHA, A. K. B.; RADY, P.; ALVES, T.; ROSAS, R. C. Prospective Observational Study of Candidemia in São Paulo, Brazil: Incidence Rate, Epidemiology, and Predictors of Mortality. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 28, p. 570–576, 2007.
- FALCÃO, D.Q.; FERNANDES, S.B.O.; MENEZES, F.S. Triterpenos de *Hyptis fasciculata* Benth. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.13, p.81-83, 2003.
- FREIRE, J.C.P.; NÓBREGA, M.T.C.; OLIVEIRA, J.K.; FREIRE, S.C.P.; RIBEIRO, E.D.; LIMA, E.O. Atividade antifúngica de fitoterápicos sobre espécies de *Candida*: uma revisão de literatura. **Arch. Health Invest.**, v. 5, n.6, p. 307-310, 2016.
- JIANG, B., et al. PAP inhibitor with In vivo efficacy identified by *Candida albicans* genetic profiling of natural products. **Chem. Biol.**, v. 15, n. 4, p. 363–374, 2008.
- KOTHAVADE, R. J.; KURA, M. M.; VALAND, A. G.; PANTHAKI, M. H. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. **J. M. Microbiol.**, v.59, n. 8, p. 873-880, 2010.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; TAKAHASHI DE MELO, N. *Tratado de Micologia Médica*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, v.44, n.5, 2002.

MENEZES, F.; KAPLAN, M.A.C. In-mixture analysis of triterpenes from *Raphiodon echinus*. **Rev. Latinoam. Quím.**, v. 34, n.1-3, p. 37, 2006.

NAKAMURA, C. V.; ISHIDA, K.; FACCIN, L. C.; FILHO, B. P. D.; CORTEZ, D. A. G.; ROZENTAL, S.; SOUZA, W.; UEDA-NAKAMURA, T. In vitro activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* L. against four *Candida* species. **Res. Microbiol.**, v.155, n. 7, p. 579–586, 2004.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod.**, v. 75, n. 3, p. 311-35. 2012.

NISBET, L. J.; MOORE, M. Will natural products remain an important source of drug research for the future? **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 8, n. 6, p. 708-712, 1997.

OLIVEIRA, M.S.M.; MIKAMI, Y.; MIYAJI, M.; GABAS, R.; MORETTI, M.L. Determinação da frequência de *Candida* spp. na cavidade oral de pacientes graves internados no Hospital de Clínicas - Unicamp, através de testes fenotípicos. **Rev. Panam. Infectol.**, v.8 , n.4, p.16-20, 2006.

OLIVEIRA, J.A.; SILVA, I.C.; TRINDADE, L.A.; LIMA, E.O.; CARLO, H.L.; CAVALCANTI, A.L.; CASTRO, R.D. Safety and Tolerability of Essential Oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume Leaves with Action on Oral Candidosis and Its Effect on the Physical Properties of the Acrylic Resin. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, v.2014, p.1-10, 2014.

PEREIRA-CENCI, T. **Avaliação da formação de biofilme de espécies de *Candida* sobre a superfície de resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses removíveis**. 2008. Tese (Doutorado em Clínica Odontológica – área de Prótese Dentária) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Piracicaba, 2008.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistente public health problem. **Clin. Microbiol. Rev.**, v 20, n. 1, p.133-63, 2007.

PRABUSEENIVASAN, S.; JAYAKUMAR, M.; IGNACIMUTHU, S. In vitroantibacterial activity of some plant essential oils. **BMC Complem. Altern. M.**, v.6, n. 39, p. 1-8, 2006.

RIBEIRO, A. S.; SILVA, D. A.; SILVA, F. P.; SANTOS, G. C.; CAMPOS, L. M. S.; OLIVEIRA, L. V. N.; SANTOS, D. A. Epidemiology and phospholipase activity of oral *Candida* spp. among patients with central nervous system diseases before and after dental cleaning procedure. **Braz. J. Microbiol.**, v. 41, n.1, p. 19-23, 2010.

RUKAYADI, Y.; HAN, S.; YONG, D.; HWAN, J-K. In vitro activity of xanthorrhizol against *Candida glabrata*, *C. guilliermondii* and *C. parapsilosis* biofilms. **Med. Mycol.**, v.49, p.1-9, 2011.

SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **Lancet Infect. Dis.** v. 2, n. 2, p. 73-85, 2002.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicityand antifungal resistance. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 36, n. 2, p. 288–305, 2012.

SOUZA, L. A. A.; RODRIGUES, S. A. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Raphiodon echinus* (Nees & Mart.) Schauer. **BioFar**, v.7, n.2, p. 12-17, 2012.

STANISZEWSKA, M.; BONDARYK, M.; OCHAL, Z. Susceptibility of *Candida albicans* to new synthetic sulfone derivatives. **Arch. Pharm. (Weinheim)**, v.348, n.2, p. 13-243, 2015.

TRINDADE, L. A, OLIVEIRA J.A., CASTRO R. D, LIMA E. O. Inhibition of adherence of *C. albicans* to dental implants and cover screws by *Cymbopogon nardus* essential oil and citronellal. **Clin. Oral Investig.**, v 19, p.1-8, 2015.

USTULIN, M.; FIGUEIREDO, B. B.; TREMEA, C.; POTT, A.; POTT, V. J.; BUENO, N. R.; CASTILHO, R. O. Plantas medicinais comercializadas no Mercado Municipal de Campo Grande-MS. **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 19, n. 3, p. 805-813, 2009.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **Int. J. Microbiol.**, v. 2012, p. 1-26, 2012.

WHITE, T. C.; MARR, K. A.; BOWDEN, R. A. Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 11, n. 2, p. 382–402, 1998.

WISPELWEY, B.; PARSONS, C. H. Agentes antifúngicos. In: BRODY. **Farmacologia Humana**. Editores: MINNEMAN, K. P.; WECKER, L. Editores consultores: LARNER, J.; BRODY, T. M. Tradução da 4ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. Cap. 50, p. 593-602.

YUHONG, H.; WEI, G.; PEIHUAN, W.; LANLAN, X.; ZHAOLING, W.; GAOYI, W.; CHUNLING, W. Simultaneous Detection of Four Common Oral *Candida* Species from Blood Samples by the Fluorescence Polarization Assay.(Report). **Cell Biochem. Biophys.**, v. 71, n. 2, p. 919-926, 2015.

4. ARTIGOS

4.1 Artigo submetido e publicado no International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Research

Comparison of Antifungal Activity of Aqueous and Ethanollic Extracts of *Rhaphiodon echinus* (Lamiaceae) against *Candida* *krusei* Clinical Strains

J. L. S. Ferreira¹; D. S. Siqueira¹; J. N. M. Cavalcante¹; R. C. M. O, Silva¹; R. C. Filgueira; R. V. Bezerra¹;
L. A. Delgado¹; H. M. B. Fernandes²; E. S. S. Vieira³; G. L. A. Maia³; E. O. Lima⁴; A. A. O. Filho^{1*}

¹Unidade Acadêmica de Ciências
Biológicas, Universidade Federal de Campina Grande,
Patos-PB, Brasil

²Hospital Universitário Ana Bezerra, Universidade
Federal do Rio Grande do Norte, Santa Cruz-RN, Brasil

³Departamento de Ciências Farmacêuticas,
Universidade Federal do Vale do São Francisco,
Petrolina-PE, Brasil

⁵Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade
Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, Brasil

Keywords: *Candida krusei*; *Rhaphiodon echinus*; medicinal plants.

ABSTRACT

The main species of clinical interest causing candidiasis, especially oral, are: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. The excessive and indiscriminate use of these drugs leads to the emergence of resistant yeasts, especially in immunosuppressed patients, susceptible to frequent infections. Thus, there is a need for the development of new therapeutical alternatives of greater effectiveness, among the possibilities, the use of herbal medicines based on medicinal plants appears as an alternative treatment. An example of a plant species present in the Brazilian Northeast and reported in the scientific literature regarding its pharmacological properties is the *Rhaphiodon echinus* plant. This work aims to evaluate the antifungal activity of the aqueous and ethanolic extract of *Rhaphiodon echinus* (Lamiaceae) against strains of *Candida krusei*. For the determination of MIC (minimum inhibitory concentration) of the extracts, the broth microdilution technique was performed. The following strains of *Candida krusei* were used: ATCC 76645, LM 106, LM 108 and LM 111. A viability control and a positive control with nystatin were performed. The results obtained showed inhibition of *Candida krusei* strains under the MIC of 512 µg / mL for the ethanolic extract and 256 µg / ml for the aqueous extract. It is concluded that the aqueous and ethanolic extract of *Rhaphiodon echinus* is effective for the strains of *Candida krusei*. Experimental tests associated with antifungal products already marketed are necessary.

1. INTRODUÇÃO:

A microbiota residente da boca é bastante diversificada, com mais de 700 espécies de microorganismos identificadas, das quais muitas ainda não foram formalmente descritas. Nessa vasta e complexa ecologia microbiana da cavidade bucal humana, encontram-se, pelo menos, vinte gêneros e, aproximadamente, noventa espécies de leveduras isoladas e classificadas^{1,2}.

O gênero *Candida* é composto por fungos leveduriformes hialinos, com formação de blastoconídios, pseudo-hifas e, ocasionalmente, hifas verdadeiras. Macroscopicamente, em culturas de ágar Sabouraud destrose, as colônias são geralmente de cor creme ou esbranquiçada e a textura pode ser lisa ou enrugada, brilhante ou seca^{3,4}. As principais espécies de interesse clínico causadoras de candidíase, em especial a oral, são: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei*^{5,6,7}.

Em relação ao tratamento da candidíase oral, grande quantidade de fármacos obtidos por meio da síntese orgânica tem sido utilizada no tratamento de infecções micóticas, como os antissépticos à base de tintura de iodo, violeta de genciana, ácido salicílico e benzoico, derivados sulfamídicos, corantes, quinonas e antifúngicos poliênicos (nistatina, anfotericina). Porém, as infecções fúngicas são de difícil tratamento, fato relacionado à elevada resistência da *Candida* frente à ação de alguns antifúngicos convencionais^{8,9}.

O uso excessivo e indiscriminado destes fármacos propicia o surgimento de leveduras resistentes, principalmente em pacientes imunossuprimidos, susceptíveis a infecções frequentes. Assim, há necessidade do desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas de maior eficácia, dentre as possibilidades, surge a utilização de fitoterápicos a base de plantas medicinais 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 doenças¹⁰.

Desta forma, as plantas medicinais constituem uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos e são amplamente estudadas a fim de encontrar compostos mais eficazes e menos tóxicos^{11,12,13}. Espécies vegetais brasileiras são usualmente utilizadas como antifúngicos e é notório que o Brasil, devido à sua diversidade vegetal, é um país conhecido mundialmente pela variedade de produtos com ação medicinal, largamente utilizados em suas diversas regiões¹⁴.

Um exemplo de espécie vegetal presente no Nordeste brasileiro e relatada na literatura científica com relação as suas propriedades farmacológicas é a planta *Rhaphiodon echinus*, uma planta brasileira, pertencente a família *Lamiaceae* e conhecida popularmente como “Betônica” e “flor-de-urubu”. Na medicina popular, suas folhas são utilizadas para diversos fins terapêuticos como por exemplo: tratamento da tosse, inflamação na cavidade oral e infecções no trato genitourinário^{15,16}.

Desta forma, com base nas informações sobre o potencial terapêutico das plantas medicinais e a importância do combate as infecções causadas por leveduras do gênero *Candida*, esse trabalho procura avaliar a possível atividade antifúngica do extrato aquoso e etanólico de *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (*Lamiaceae*).

2. METODOLOGIA

Ensaio in vitro

Substância-teste

Para os ensaios foram utilizados os extratos aquoso e etanólico das partes aéreas de *Rhaphiodon echinus*, que foram cedidos pela equipe da Prof^a. Dr^a. Gabriela Lemos de Azevedo Maia, da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF).

Os extratos foram conservados em frasco de vidro âmbar e mantidos sob refrigeração. As emulsões dos extratos nas diferentes concentrações foram preparadas no momento de execução dos ensaios. Foi usado 5% de DMSO e 2% de Tween 80. E através de diluições em água destilada ou no próprio meio de cultura foram obtidas as concentrações desejadas de ambos os extratos.

Espécies Fúngicas

Foram utilizadas quatro cepas de *Candida krusei* (LM 08, LM 13, LM 656 e LM 978), previamente isoladas, identificadas e gentilmente cedidas pelo Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal da Paraíba, sob a direção da Prof^a. Dr^a Edeltrudes de Oliveira Lima.

Todas as cepas foram mantidas em ágar Sabouraud dextrose (ASD) a uma temperatura de 4°C, sendo utilizados para os ensaios repiques de 24 horas em ASD incubados a 35 °C. No

estudo da atividade antifúngica foi utilizado um inóculo fúngico de aproximadamente $1 - 5 \times 10^6$ UFC/mL padronizado de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland^{17,18}.

Meios de cultura

Foram utilizados os meios ágar Sabouraud dextrose - ASD (Difco Lab., USA) para manutenção dos micro-organismos; e caldo Sabouraud dextrose - CSD (Difco Lab., USA) para os ensaios in vitro; preparados conforme as instruções do fabricante.

Fármaco antifúngico

Foi utilizado como antifúngico padrão (controle positivo), a Nistatina em pó (Pharma Nostra, Rio de Janeiro). As soluções foram preparadas no momento de execução dos testes, para alcance das concentrações desejadas.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As Concentrações inibitórias mínimas dos extratos aquoso e etanólico de *Raphiodon echinus* foram determinadas pela técnica de microdiluição em caldo^{17,18}. Foram utilizadas placas de 96 orifícios estéreis e com tampa. Em cada orifício da placa, foi adicionado 100 µL do meio líquido CSD duplamente concentrado.

Em seguida, 100 µL da emulsão do extrato na concentração inicial de 2048 µg/mL (também duplamente concentrado), foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada em razão de dois, foram obtidas as concentrações de 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 e 4 µg/mL, de modo que na primeira linha da placa encontra-se a maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim, foi adicionado 10 µL do inóculo de aproximadamente $1-5 \times 10^6$ UFC/mL das espécies fúngicas nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica, especificamente.

Paralelamente, foi realizado o mesmo ensaio com o antifúngico nistatina. Um controle de micro-organismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100 µL do mesmo CSD duplamente concentrado, 100 µL de água destilada estéril e 10 µL do inóculo de cada espécie.

Para verificar a ausência de interferência nos resultados pelos solventes utilizados na preparação da emulsão, no caso o DMSO e o Tween 80, foi feito um controle no qual foram colocados nas cavidades 100 µL do caldo duplamente concentrado, 50 µL de DMSO (5%), 50

μL de Tween 80 (2%) e $10\mu\text{L}$ da suspensão fúngica. Um controle de esterilidade do meio também foi realizado, onde foi colocado $200\mu\text{L}$ do CSD em um orifício sem a suspensão dos fungos.

As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a 35°C por 24 - 48 hs para ser realizada a leitura. A CIM para os extratos e antifúngico foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico verificado nos orifícios quando comparado com o crescimento controle. Os experimentos foram realizados em duplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é referida como a menor concentração de uma substância teste capaz de inibir o crescimento microbiano de maneira visível. A CIM_{50} é dita como a menor concentração capaz de inibir 50% das cepas durante o experimento;

Seguindo a premissa, observa-se que a CIM_{50} do extrato aquoso para *Candida krusei* é de $256\mu\text{g/mL}$. A CIM_{50} do extrato etanólico de *Rhaphiodon echinus* contra as cepas de *Candida krusei* é de $512\mu\text{g/mL}$. Os dados obtidos estão presentes nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) em $\mu\text{g/mL}$ do extrato aquoso de *Rhaphiodon echinus* contra cepas de *Candida krusei*.

CEPA FÚNGICA	CIM
LM 08	$512\mu\text{g/mL}$
LM 13	-
LM 656	$256\mu\text{g/mL}$
LM 978	$256\mu\text{g/mL}$
Controle positivo	+
Controle negativo	-

(-) = não houve inibição visível da cepa

(+) = inibição visível da cepa

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) em $\mu\text{g/mL}$ do extrato etanólico de *Rhaphiodon echinus* contra cepas de *Candida krusei*.

CEPA FÚNGICA	CIM
LM 08	512 $\mu\text{g/mL}$
LM 13	512 $\mu\text{g/mL}$
LM 656	512 $\mu\text{g/mL}$
LM 978	512 $\mu\text{g/mL}$
Controle positivo	+
Controle negativo	-

(-) = não houve inibição visível da cepa
 (+) = inibição visível da cepa

Comparando os resultados obtidos após os experimentos, observa-se que o extrato aquoso é mais efetivo contra as cepas de *Candida*, visto que a CIM₅₀ é menor que a CIM₅₀ do extrato etanólico. Segundo Sartoratto et al. (2004), o potencial antifúngico é dito forte quando a CIM atinge valores inferiores a 500 $\mu\text{g/mL}$, é dito moderado entre 600 – 1500 $\mu\text{g/mL}$ e considerado fraco quando os valores da CIM ultrapassarem 1500 $\mu\text{g/mL}$. O extrato aquoso e etanólico de *Rhaphiodon echinus* demonstraram forte atividade antifúngica sobre as cepas de *Candida krusei*, visto que obtiveram CIM₅₀ menor que 600 $\mu\text{g/mL}$ ¹⁹.

Salari et al. (2016) avaliou a atividade antifúngica do extrato metanólico de *Salvia rhytidea* Benth. (Lamiaceae) contra isolados de várias espécies de *Candida*, onde o valor de inibição do crescimento mostrou que os isolados de *Candida krusei* estão entre os mais suscetíveis ao extrato²⁰.

Ibrahim et al. (2017) observaram em estudos, a susceptibilidade de cepas de *Candida krusei* e *Candida glabrata* contra o óleo essencial de *Mentha australis*, pertencente a família Lamiaceae; Violante et al. (2012) avaliaram o efeito de *Hyptis crenata*, Lamiaceae do cerrado brasileiro, sobre as espécies de *Candida*, onde um forte efeito inibitório foi observado^{21,22}.

Costa et al. (2017) verificou o potencial antifúngico de *Raphiodon echinus* sobre as cepas de diferentes espécies de *Candida* e observou efeito modulatório dos extratos quando associado com antifúngicos sintéticos²³.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que os extratos aquoso e etanólico de *Rhaphiodon echinus* são eficazes contra as cepas de *C. krusei*, sendo assim, mais estudos são necessários para desvendar o mecanismo de ação da atividade antifúngica destes produtos naturais.

5. AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal de Campina Grande pelo suporte e assistência.

REFERÊNCIAS

1. McIntyre G. Oral candidosis. Dent Update. 2001;28:132-139.
2. Yuhong H, Wei G, Peihuan W, Lanlan X, Zhaoling W, Gaoyi W et al. Simultaneous Detection of Four Common Oral Candida Species from Blood Samples by the Fluorescence Polarization Assay. (report). Cell Biochem Biophysics. 2015;71(2):919-926.
3. Lacaz C, Porto E, Martins J, Heins-Vaccari E, Takahashi de Melo N. Tratado de Micologia Médica. Rev Inst Med Trop. 2002;44(5).
4. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis biology, epidemiology, pathogenicity, and antifungal resistance. FEMS Microbiology Reviews. 2012;36(2):288-305.
5. Colombo A, Guimarães T, Silva L, Monfardini L, Cunha A, Rady P et al. Prospective Observational Study of Candidemia in São Paulo, Brazil: Incidence Rate, Epidemiology, and Predictors of Mortality. Infection Control & Hospital Epidemiology. 2007;28(05):570-576.
6. Kothavade R, Kura M, Valand A, Panthaki M. Candida tropicalis: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. Journal of Medical Microbiology. 2010;59(8):873-880.
7. Ribeiro A, Silva D, Silva F, Santos G, Campos L, Oliveira L et al. Epidemiology and phospholipase activity of oral Candida spp. among patients with central nervous system diseases before and after dental cleaning procedure. Brazilian Journal of Microbiology. 2010;41(1):19-23.
8. Araújo J, Lima E, Ceballos B, Freira K, Souza E. Ação antimicrobial de óleos essenciais sobre microorganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. REV PAT TRO. 2004;33:55-64.
9. Vandeputte P, Ferrari S, Coste A. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. International Journal of Microbiology. 2012;2012:1-26.
10. Andrade M, Cardoso M, Batista L, Mallet A, Machado S. Óleos essenciais de Cymbopogon nardus, Cinnamomum zeylanicum e Zingiber officinale: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. Revista Ciência Agronômica. 2012;43(2):399-408.
11. Nakamura C, Ishida K, Faccin L, Filho B, Cortez D, Rozental S et al. In-vitro activity of essential oil from Ocimum gratissimum L. against four Candida species. Research in Microbiology. 2004;155(7):579-586.
12. Oliveira M, Mikami Y, Miyaji M, Gabas R, Moretti M. Determinação da frequência de Candida spp. Na cavidade oral de pacientes graves internados no Hospital de Clínicas - Unicamp, através de testes fenotípicos. Rev Panam Infect. 2006;8(4):16-20.
13. Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. In the vitro antibacterial activity of some plant essential oils. BMC Comp Atern Med. 2006;6(39):1-8.

14. Botelho M, Nogueira N, Bastos G, Fonseca S, Lemos T, Matos F et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2007;40(3):349-356.
15. de Albuquerque U, de Medeiros P, de Almeida A, Monteiro J, de Freitas Lins Neto E, de Melo J et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007;114(3):325-354.
16. Menezes F, Kaplan M. In-mixture analysis of triterpenes from *Raphiodon echinus*. *Rev Latin Quim*. 2006;34:37.
17. Cleeland R, Squires E. Evaluation of new antimicrobials *in-vitro* and in experimental animal infections. 1st ed. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. New York: Williams & Wilkins; 1991. p. 739-788.
18. Hadacek F, Greger H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis*. 2000;11(3):137-147.
19. Sartoratto A, Machado A, Delarmelina C, Figueira G, Duarte M, Rehder V. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2004;35(4):275-280.
20. Salari S, Bakhshi T, Sharififar F, Naseri A, Ghasemi Nejad Almani P. Evaluation of antifungal activity of standardized extract of *Salvia rhytidea* Benth. (Lamiaceae) against various *Candida* isolates. *Journal de Mycologie Médicale*. 2016;26(4):323-330.
21. Ibrahim S, Abdallah H, Mohamed G, Farag M, Alshali K, Alsherif E et al. Volatile oil profile of some lamiaceous plants growing in Saudi Arabia and their biological activities. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2017;72(1-2):35-41.
22. Violante I, Hamerski L, Garcez W, Batista A, Chang M, Pott V et al. Antimicrobial activity of some medicinal plants from the cerrado of the central-western region of Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2012;43(4):1302-1308.
23. Costa AR. et al. *Raphiodon echinus* (Ness & Mart.) Schauer: Chemical, toxicological activity and increased antibiotic activity as antifungal drug activity and antibacterial. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 107:280-286.

4.2 Artigo submetido e aceito na Revista UNINGÁ

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS ETANÓLICO E AQUOSO DE *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (*Lamiaceae*) CONTRA CEPAS DE *Candida albicans*

EVALUATION OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF ETHANOLIC AND AQUEOUS EXTRACTS OF *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (*Lamiaceae*) CONTRA CEPAS DE *Candida albicans*

José Lucas Soares Ferreira¹; Daniele de Souza Siqueira¹; Joyce Natielle Miranda Cavalcante¹; Abrahão Alves de Oliveira Filho²

¹ Acadêmicos do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) – Campus Patos/PB.

E-mail: Jlucas_sf@hotmail.com

E-mail: danielleodonto13@gmail.com

E-mail: joyce_natielle@hotmail.com

² Professor Adjunto do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) – Campus Patos/PB.

E-mail: abrahão.farm@gmail.com

Resumo: Indivíduos saudáveis podem apresentar alguns dos gêneros da *Cândida* na cavidade oral, porém cerca de oito espécies podem desencadear a candidíase oral e uma delas é a *Candida albicans*, uma das mais patogênicas e de maior importância odontológica. A candidíase é causada por leveduras, essa micose apresenta um espectro clínico bem variável, podendo se comportar como uma lesão branda, aguda ou crônica. O uso indiscriminado de antifúngicos disponíveis é o principal responsável pela resistência fúngica. Dessa forma, há a necessidade de inovar a área farmacológica através das pesquisas por medicamentos de origem natural ou sintética que vêm sendo uma alternativa eficaz e econômica. Esse trabalho procura analisar a possível atividade antifúngica dos extratos etanólico e aquoso de *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (*Lamiaceae*), espécie vegetal presente no Nordeste brasileiro, contra cepas de *Candida albicans*. Foram analisadas as atividades antifúngicas dos extratos etanólico e aquoso de *Rhaphiodon echinus* sobre cepas de *Candida albicans* (ATCC 76645, LM 106, LM 108 e LM 111), obtendo a Concentração Inibitória Mínima (CIM) por meio de ensaios *in vitro* utilizando a técnica de microdiluição em caldo. A CIM₅₀ do extrato aquoso de *Rhaphiodon echinus* contra as cepas de *Candida albicans* foi de 256 µg/mL. A CIM₅₀ do extrato etanólico de *Rhaphiodon echinus* contra as cepas de *Candida albicans* foi de 256 µg/mL, tendo assim o mesmo efeito quando comparadas. Conclui-se que os extratos de *Rhaphiodon echinus* são eficazes contra as cepas de *C. albicans*.

Palavras chaves:

Candida albicans; *Rhaphiodon echinus*; plantas medicinais.

Abstract: Healthy individuals may present some of the genera of *Candida* in the oral cavity, but about eight species may trigger oral candidiasis and one of them is *Candida albicans*, one of the most pathogenic and of major dental importance. Candidiasis is caused by yeast, this mycosis has a very variable clinical spectrum and may behave as a mild, acute or chronic lesion. The indiscriminate use of available antifungal agents is primarily responsible for fungal resistance. Thus, there was a need to innovate the pharmacological area through research on drugs of natural or synthetic origin that have been an effective and economical alternative. This work aims to analyze the possible antifungal activity of ethanolic and aqueous extracts of *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (*Lamiaceae*), a plant species present in the Brazilian Northeast, against strains of *Candida albicans*. Thus, the present work aimed to analyze the antifungal activity of ethanolic and aqueous extracts of *Rhaphiodon echinus* on strains of *Candida albicans* (ATCC 76645, LM 106, LM 108 and LM 111), obtaining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by means of assays in vitro using broth microdilution technique. CIM₅₀ of the aqueous extract of *Rhaphiodon echinus* against *Candida albicans* strains was 256 µg / mL. The CIM₅₀ of the ethanolic extract of *Rhaphiodon echinus* against the strains of *Candida albicans* was 256 µg / mL, thus having the same effect when compared. It is concluded that extracts of *Rhaphiodon echinus* are effective against strains of *C. albicans*

Keywords:

Candida albicans; *Rhaphiodon echinus*; medicinal plants.

INTRODUÇÃO

A cavidade oral é colonizada por uma comunidade de microrganismos que constituem a microbiota residente, composta principalmente por bactérias e fungos. Atualmente, mais de 700 espécies de microrganismos já foram identificados. Há evidências demonstrando que a microbiota pode exercer efeitos positivos e negativos sobre a saúde do hospedeiro, formando um ecossistema complexo, cujas consequências disso sobre o indivíduo serão variáveis e dependerão de fatores que influenciam o equilíbrio dinâmico entre microrganismos e hospedeiro (MAGALHÃES et al., 2005).

Candidíase ou candidose 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 (FREIRE et al., 2016).

O gênero *Candida* é composto por fungos leveduriformes hialinos, com formação de blastoconídios, pseudo-hifas e, ocasionalmente, hifas verdadeiras. Macroscopicamente, em culturas de ágar Sabouraud destrose, as colônias são geralmente de cor creme ou esbranquiçada e a textura pode ser lisa ou enrugada, brilhante ou seca (LACAZ et al., 2002; SILVA et al., 2012).

Segundo Pfaller e Diekema (2007), mais de 17 espécies diferentes do gênero *Candida* são conhecidas como agentes etiológicos de infecções em humanos, entretanto mais de 90% das infecções invasivas são causadas por *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*.

Entre as espécies pertencentes ao gênero *Candida*, a *Candida albicans* é considerada como uma das mais patogênicas, bem como a espécie de maior importância odontológica, sendo que sua ocorrência neste sítio anatômico representa 20% a 60% de todos os isolados. Assim, apresenta-se como um dos agentes patógenos mais importantes encontrados na cavidade oral (HERNÁNDEZSOLÍS et al., 2014).

A candidose bucal pode afetar a qualidade de vida e dificultar a alimentação devido à presença de sangramento, exsudação, sensação de queimação, dor, halitose, gosto desagradável e secura da boca (ARENDORF et al., 1987). Além disso, a infecção por *Candida* spp. é de difícil controle, devido à sua natureza multifatorial e ao pequeno número de drogas disponíveis para seu tratamento (BATISTA et al., 1999).

Além de diversas formas de candidose, essas leveduras podem estar envolvidas em lesões endodônticas persistentes e doenças periodontais (SUNDQVIST et al., 1998). Waltimo et al. (1997) afirmaram que leveduras, especialmente *C. albicans*, são resistentes ao tratamento convencional em 7% dos casos de lesão periapical, tornando-se importante a investigação de produtos naturais contra *Candida* que possam ser utilizados.

Vários Medicamentos antifúngicos vêm sendo desenvolvidos para o tratamento da *candida* bucal, como os antissépticos à base de tintura de iodo,

iodoquinol, violeta de genciana, ácido salicílico e benzoico, derivados sulfamídicos, corantes, quinonas e antifúngicos poliênicos (nistatina, anfotericina B). Além desses também temos os antifúngicos azóis que são: agentes do imidazol (cetoconazol, clotrimazol) e os agentes triazóis (fluconazol e Itraconazol). Porém, as infecções fúngicas são de difícil tratamento, fato relacionado à elevada resistência da *Candida* frente à ação de alguns antifúngicos convencionais (ARAÚJO et al., 2004; VANDEPUTTE et al., 2012).

O uso excessivo e indiscriminado destes fármacos propicia o surgimento de leveduras resistentes, principalmente em pacientes imunossuprimidos, susceptíveis a infecções frequentes. Assim, há necessidade do desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas de maior eficácia, dentre as possibilidades, surge a utilização de fitoterápicos a base de plantas medicinais 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).

As plantas com propriedades terapêuticas para o cuidado da saúde são utilizadas desde a antiguidade até os dias atuais, e vêm constituindo uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos que contem uma série de substâncias que podem ser utilizadas para os tratamentos de diferentes doenças infecciosas. Elas aparecem como parte do cuidado tradicional de saúde em muitas partes do mundo e têm despertado o interesse de vários pesquisadores. (ANDRADE, T.U. et al., 2010)

A utilização de plantas medicinais com finalidade terapêutica é de origem popular, entretanto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) incentivou o estudo científico dessas plantas a partir dos anos setenta, objetivando o conhecimento dos benefícios desses agentes medicinais e os riscos quando consumidos de forma exagerada. Diversos fatores têm colaborado com o desenvolvimento de práticas de saúde que incluam plantas medicinais, principalmente baixo custo e fácil manuseio (ALMEIDA e MENEZES, 2002).

Entre os óleos essenciais encontrados no Brasil destaca-se o óleo oriundo da planta *Rhaphiodon echinus*, uma espécie vegetal encontrada na Caatinga, pertencente à família da Lamiaceae e conhecida popularmente como flor-de-urubu. Na medicina tradicional a infusão da planta é usada no tratamento da tosse e inflamação na cavidade oral, porém o extrato aquoso desta planta demonstrou atividade anti-inflamatória e também analgésica. (MENEZES et al., 1998; TORRES et al., 2009).

Desta forma, com base nas informações sobre o potencial terapêutico das plantas medicinais e a importância do combate as infecções causadas por leveduras do gênero *Candida*, esse trabalho procurou avaliar a possível atividade antifúngica dos extratos etanólico e aquoso de *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (*Lamiaceae*) contra cepas de *Candida albicans*.

METODOLOGIA

Ensaio *in vitro*

Substância-teste

Para os ensaios desta pesquisa foram utilizados os extratos aquoso e etanólico das partes aéreas de *Raphiodon echinus*, que foram cedidos pela equipe da Prof^a. Dr^a. Gabriela Lemos de Azevedo Maia, da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF).

Os extratos foram conservados em frasco de vidro âmbar e mantidos sob refrigeração. As emulsões dos extratos nas diferentes concentrações foram preparadas no momento de execução dos ensaios. Em um tubo de ensaio esterilizado, foi adicionado 60.000 µg do extrato aquoso, 0,15 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), 0,06 mL de Tween 80 (INLAB/Indústria Brasileira) e quantidade suficiente para 3 mL de água destilada estéril.

O mesmo preparo foi realizado com o extrato etanólico em outro tubo de ensaio. As misturas foram agitadas por 5 minutos em aparelho Vortex (Fanem), obtendo emulsões com concentração de 20.000 µg/mL de extrato, 5% de DMSO e 2% de Tween 80. E através de diluições em água destilada ou no próprio meio de cultura foram obtidas as concentrações desejadas de ambos os extratos.

Espécies Fúngicas

Foram utilizadas quatro cepas de *Candida albicans* (ATCC 76645, LM 106, LM 108 e LM 111), previamente isoladas, identificadas e gentilmente cedidas pelo Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal da Paraíba, sob a direção da Prof^a. Dr^a Edeltrudes de Oliveira Lima.

Todas as cepas foram mantidas em ágar Sabouraud dextrose (ASD) a uma temperatura de 4°C, sendo utilizados para os ensaios repiques de 24 horas em ASD incubados a 35 °C. No estudo da atividade antimicrobiana foi utilizado um inóculo fúngico de aproximadamente $1 - 5 \times 10^6$ UFC/mL padronizado de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK, GREGER, 2000).

Meios de cultura

Foi utilizado o meio ágar Sabouraud dextrose - ASD (Difco Lab., USA) para manutenção dos micro-organismos; preparados conforme as instruções do fabricante.

Fármaco antifúngico

Foi utilizado como antifúngico padrão (controle positivo), a nistatina em pó (Pharma Nostra, Rio de Janeiro). As soluções foram preparadas no momento de execução dos testes, para alcance das concentrações desejadas.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As Concentrações inibitórias mínimas dos extratos aquoso e etanólico de *Raphiodon echinus* foram determinadas pela técnica de microdiluição em caldo (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK, GREGER, 2000). Foram utilizadas placas de 96 orifícios estéreis e com tampa. Em cada orifício da placa, foram adicionados 100 µL do meio líquido Caldo Sabouraud Dextrose (CSD) duplamente concentrado.

Em seguida, 100 µL da emulsão do extrato na concentração inicial de 2048 µg/mL (também duplamente concentrado), foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada em razão de dois, foram obtidas as concentrações de 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 e 4 µg/mL, de modo que na primeira linha da placa encontra-se a maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim, foram adicionados 10 µL do inóculo de aproximadamente $1-5 \times 10^6$ UFC/mL das espécies fúngicas nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica, especificamente.

Paralelamente, foi realizado o mesmo ensaio com o antifúngico nistatina nas concentrações de 1024 µg/mL a 4 µg/mL. Um controle de micro-organismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100 µL do mesmo CSD duplamente concentrado, 100 µL de água destilada estéril e 10 µL do inóculo de cada espécie.

Para verificar a ausência de interferência nos resultados pelos solventes utilizados na preparação da emulsão, no caso o DMSO (dimetilsulfóxido) e o Tween 80, foi feito um controle no qual foram colocados nas cavidades 100 µL do caldo duplamente concentrado, 50 µL de DMSO (5%), 50 µL de Tween 80 (2%) e 10 µL da suspensão fúngica. Um controle de esterilidade do meio também foi realizado, onde foi colocado 200 µL do CSD em um orifício sem a suspensão dos fungos.

As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a 35°C por 24 - 48 hs para ser realizada a leitura. A CIM para os extratos e antifúngico foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico verificado nos orifícios quando comparado com o crescimento controle. Os experimentos foram realizados em duplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é referida como a menor concentração de uma substância teste capaz de inibir o crescimento microbiano de maneira visível. Os dados obtidos estão presentes na tabela abaixo. A CIM₅₀ é dita

como a menor concentração capaz de inibir 50% das cepas durante o experimento; seguindo a premissa, observa-se que a CIM₅₀ do extrato aquoso para *Candida albicans* foi de 256 µg/mL (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL do extrato aquoso de *Rhaphiodon echinus* contra cepas de *Candida albicans*.

CEPA FÚNGICA	CIM
ATCC 76645	1024 µg/mL
LM 106	256 µg/mL
LM 108	256 µg/mL
LM 111	512 µg/mL
Controle positivo	+
Controle negativo	-

(-) = não houve inibição visível da cepa

(+) = inibição visível da cepa

A tabela 2 resume os resultados obtidos dos testes de microdiluição do extrato etanólico de *Rhaphiodon echinus*. A CIM₅₀ do extrato etanólico para *Candida albicans* foi de 256 µg/mL. Segundo Sartoratto et al. (2004), o potencial antifúngico é dito forte quando a CIM atinge valores inferiores a 500 µg/mL, moderado entre 600 µg/mL – 1500 µg/mL e considerado fraco quando os valores da CIM ultrapassarem 1500 µg/mL. Os extratos aquoso e etanólico de *Rhaphiodon echinus* demonstraram forte atividade antifúngica sobre as cepas de *Candida albicans* visto que obtiveram CIM₅₀ inferiores a 500 µg/mL.

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL do extrato etanólico de *Rhaphiodon echinus* contra cepas de *Candida albicans*.

CEPA FÚNGICA	CIM
ATCC 76645	1024 µg/mL
LM 106	256 µg/mL
LM 108	256 µg/mL
LM 111	128 µg/mL
Controle positivo	+
Controle negativo	-

(-) = não houve inibição visível da cepa

(+) = inibição visível da cepa

Comparando os resultados obtidos após os experimentos, observa-se que os extratos apresentaram o mesmo efeito contra as cepas, tendo uma CIM_{50%} de 256 µg/mL. Kremer et al. (2013) avaliou as propriedades antifúngicas dos extratos etanólicos das folhas de *Teucrium arduini* L. (*lamiaceae*) contra cepas de *Candida albicans*. Os resultados sugeriram susceptibilidade de *Candida albicans* contra os extratos etanólico de *Teucrium arduini* L. (*lamiaceae*).

. Salaris et al. (2016) avaliou as propriedades antifúngicas dos extratos metanólicos de *Salvia rhytidea* Benth. (*lamiaceae*) contra cepas de *Candida albicans*, *parapsilosis*, *glabrata*, *tropicalis*, *lusitaniae*, *krusei* e *guilliermondii*, utilizando um método de microdiluição em caldo. Os resultados revelaram que os isolados de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* foram mais susceptíveis aos extratos metanólicos de *Salvia rhytidea* Benth. (*lamiaceae*).

CONCLUSÃO

Diante do que foi exposto se observa o grande potencial e eficácia do extrato aquoso e etanólico da planta *Rhaphiodon Echinus* na ação antifúngica sobre a *Candida albicans*, pode ser considerado um recurso promissor para o tratamento de muitas enfermidades. No entanto, ainda existem poucos estudos nessa área, o que revela a necessidade de se intensificar mais estudos sobre o assunto.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, M.A.; CARDOSO, M.G.; BATISTA, L.R.; MALLET, A.C.T.; MACHADO, S.M.F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista de Ciências Agrônômica**, v.43, n.2, p.399-408, 2012.

ARAÚJO, J.C.L.V.; LIMA, E.O.; CEBALLOS, B.S.O.; FREIRA, K.R.L.; SOUZA, E.L. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microorganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista Patologia Tropical**, v. 33, p. 55-64 , 2004

BARCELOS, F. F. et al. Estudo químico e da atividade biológica cardiovascular do óleo essencial de folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Burtt & RM Sm. em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 1, p. 48-56, 2010.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. In: Lorian, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. New York: Willians & Wilkins, p. 739-788, 1991.

FREIRE, J.C.; NÓBREGA, M.T.; OLIVEIRA, J.K.; FREIRE, S.C.; RIBEIRO, E.D.; LIMA, E.O. Atividade antifúngica de fitoterápicos sobre espécies de *Candida*: uma revisão de literatura. **Archives of Health Investigation**, v. 5, n.6, p. 307-310, 2016.

HERNÁNDEZ-SOLÍS, S. E.; RUEDA-GORDILLO, F.; ROJAS-HERRERA, R. A. Actividad de la proteinasa en cepas de *Candida albicans* aisladas de la cavidad oral de pacientes inmunodeprimidos, con candidiasis oral y sujetos sanos. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.31, n. 2, p. 137-140, 2014.

KREMER, D. et al. Investigation of chemical compounds, antioxidant and antimicrobial properties of *Teucrium arduini* L.(Lamiaceae). **Current drug targets**, v. 14, n. 9, p. 1006-1014, 2013.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; TAKAHASHI DE MELO, N. Tratado de Micologia Médica. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.44, n.5, 2002.

MENEZES, F. S.; KAPLAN, M. A. K.; CARDOSO, G. L. C; PEREIRA, N. A. Phytochemical and pharmacological studies on *Raphiodon echinus*. **Fitoterapia**, v. 69, n. 5, p. 459-460, 1998.

MOURÃO, P.; Henrique, O.; MAGALHÃES, P. P.; MENDES, E. N. Microbiota indígena de seres humanos 2005.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistente public health problem. **Clinical Microbiology Review**, v 20, n. 1, p.133-63, 2007.

SALARI, S. et al. Evaluation of antifungal activity of standardized extract of *Salvia rhytidea* Benth.(Lamiaceae) against various *Candida* isolates. **Journal de mycologie medicale**, v. 26, n. 4, p. 323-330, 2016.

SARTORATTO, A.; Machado, A. L. M.; Delarmelina, C.; Figueira, G. M.; Duarte, M. C. T.; Rehder, V.L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Braz. J. Microbiol.** 2004; 35: 275 – 280.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1-26, 2012.

ARENDORF, T. M.; WALKER, D. M. Denture stomatitis: a review. **Journal of oral rehabilitation**, v. 14, n. 3, p. 217-227, 1987.

BATISTA, J. M.; BIRMAN, E. G.; CURY, A. E. Suscetibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v. 13, n. 4, p. 343-348, 1999.

DE ALMEIDA, E. C.; MENEZES, H. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 8, n. 2, p. 191-212, 2002.

WALTIMO, T. M. T. et al. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. **International Endodontic Journal**, v. 30, n. 2, p. 96-101, 1997.

SUNDQVIST, G. et al. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surgery, Oral**

Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics, v. 85, n. 1, p. 86-93, 1998.

4.3 Artigo submetido na Revista UNINCOR

COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO AQUOSO E DO EXTRATO ETANÓLICO DE *RHAPHIODON ECHINUS* (LAMIACEAE) CONTRA CEPAS *CANDIDA TROPICALIS*

José Lucas Soares Ferreira

Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)
jluucas_sf@hotmail.com

Joyce Natiele Miranda Cavalcante

Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

Daniele de Souza Siqueira

Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

Raquel Vieira Bezerra

Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

Letícia Ataíde Delgado

Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

Heloísa Mara Batista Fernandes de Oliveira

Universidade Federal do Rio Grande do Norte
(UFRN)

Eric de Souza Soares Vieira

Universidade do Vale do São Francisco (UNIVASF)

Gabriela Lemos de Azevedo Maia

Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Edeltrudes de Oliveira Lima

Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Abrahão Alves de Oliveira Filho

Professor Adjunto do Curso de Odontologia da
Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)
abraham.farm@gmail.com

RESUMO

A microbiota residente da boca é bastante diversificada, com mais de 700 espécies de microorganismos identificadas, das quais muitas ainda não foram descritas. Nessa vasta ecologia microbiana da cavidade bucal, encontram-se, pelo menos, vinte gêneros e, aproximadamente, noventa espécies de leveduras isoladas e classificadas. Os métodos convencionais para o tratamento de candidíase são baseados na utilização de agentes antifúngicos, porém, são observados vários inconvenientes quando da utilização dos mesmos, representados por toxicidade, interações antagonicas fármaco-fármaco, falta de eficácia fungicida, alto custo e surgimento de espécies resistentes, entre outras. Na busca por novas estratégias terapêuticas para a candidíase oral, estudos utilizando plantas medicinais estão sendo cada vez mais realizados. Essa pesquisa procura analisar a possível atividade antifúngica do extrato aquoso e etanólico de *Rhaphiodon echinus* (Lamiaceae) contra cepas de *Candida tropicalis*. Para a determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) do extrato, foi realizada a técnica da microdiluição em caldo. Utilizaram-se as seguintes cepas de *Candida tropicalis* (ATCC 13803, LM 14, LM 31 e LM 36). Foi realizado controle de viabilidade das cepas ensaiadas, e também controle de sensibilidade com o antimicrobiano Nistatina. As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a 35°C por 24 - 48 hs e se realizou a leitura. Diante dos resultados observou-se que CIM₅₀ do extrato aquoso e etanólico de *Rhaphiodon echinus* contra as cepas de *Candida tropicalis* foi de 512 µg/mL. Conclui-se que os extratos de *Rhaphiodon echinus* são eficazes contra as cepas de *C. tropicalis*.

Palavras-chave: *Rhaphiodon echinus*. *Candida tropicalis*. Plantas medicinais.

**COMPARATION OF THE
ANTIFUNGAL ACTIVITY OF
THE AQUEOUS AND
ETHANOLIC EXTRACTS OF
RHAPHIODON ECHINUS
(LAMIACEAE) AGAINST
STRAINS *CANDIDA*
*TROPICALIS***

ABSTRACT

The resident microbiota of the mouth is quite diverse, with more than 700 species of microorganisms identified, many of which have not yet been described. In this vast microbial ecology of the oral cavity, there are at least twenty genera and approximately ninety species of isolated and classified yeasts. Conventional methods for the treatment of candidiasis are based on the use of antifungal agents, however, a number of drawbacks are observed when using them, represented by toxicity, antagonistic drug-drug interactions, lack of fungicidal efficacy, high cost and emergence of resistant species, among others. In the search for new therapeutic strategies for oral candidiasis, studies using medicinal plants are being increasingly performed. This research aims to analyze the possible antifungal activity of the aqueous and ethanolic extract of *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (Lamiaceae) against strains of *Candida tropicalis*. For the determination of MIC (Minimum Inhibitory Concentration) of the extract, the broth microdilution technique was performed. The following strains of *Candida tropicalis* (ATCC 13803, LM 14, LM 31 and LM 36) were used. Viability control of the strains tested, as well as sensitivity control with the antimicrobial Nystatin 100 IU / mL. The plates were aseptically closed and incubated at 35 ° C for 24-48 hours and read. In view of the results, it was observed that MIC₅₀ of the aqueous and ethanolic extract of *Rhaphiodon echinus* against the strains of *Candida tropicalis* was 512 µg / mL. It is concluded that the extracts of *Rhaphiodon echinus* are effective against the strains of *C. tropicalis*.

Keywords: *Rhaphiodon echinus*. *Candida tropicalis*. Medicinal plants.

INTRODUÇÃO

A candidíase constitui um espectro de infecções causadas por fungos do gênero *Candida*. O agente mais comum é a *Candida albicans*, mas outras espécies também têm sido identificadas, como, por exemplo, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. krusei*, entre outras (CRISSEY J, LANG H e PARISH LC, 1995).

Vários fatores são citados como responsáveis pela ocorrência das candidíases orais, alguns relacionados ao hospedeiro e outros à própria levedura. Os mais citados relacionados ao hospedeiro são: diabetes mellitus (DM), perda de dentes, restaurações, aparelhos (ortodônticos e protéticos), mudanças de hábitos alimentares, higiene oral, doenças sistêmicas, alterações hormonais, certas drogas sistêmicas e locais, imunodepressão, radiação e quimioterapia (PAULA, 1998).

O aumento da resistência a antifúngicos alerta para a necessidade do desenvolvimento de estratégias que evitem a sua disseminação entre os fungos, como já ocorreu com as bactérias, que se encontra disseminada e fora de controle (CANUTO MM & RODERO FG, 2002).

As plantas medicinais são importantes por fornecerem matéria-prima para a síntese de drogas, além de serem utilizadas como agentes terapêuticos alternativos. O emprego das plantas é supervalorizado no uso tradicional com base nos seus benefícios medicinais. Dessa forma, torna-se imprescindível o conhecimento sobre a dose e a parte empregada da planta, além de suas propriedades terapêuticas, pois existem aquelas que são altamente tóxicas, mesmo em pequenas doses (ZHAN & ZHOU, 2003).

Visando contribuir com este cenário atual, a química de produtos naturais de vegetais tem por objetivo avançar na identificação e elucidação estrutural de compostos com atividades biológicas, bem como na avaliação de propriedades conferidas a seus metabólitos (BRAZ FILHO, 2010).

A família Lamiaceae é composta por aproximadamente 240 gêneros e 7200 espécies, ocorrendo em todo o mundo desde regiões tropicais até áreas de clima temperado, com exceção da Antártida. No Brasil, são encontrados 32 gêneros e 496 espécies, sendo muitas destas espécies endêmicas do semiárido nordestino, com destaque para o gênero *Hyptis* e *Rhaphiodon* (HARLEY, 2012).

Em relação aos componentes químicos, a família Lamiaceae desperta grande interesse no estudo dos metabólitos secundários, como alcaloides flavonoides, terpenos, cumarinas, lignoides e os óleos essenciais (FERREIRA, 2009).

Óleos essenciais são produtos resultantes do metabolismo secundário das plantas, podendo ser extraídos por todos os órgãos, como brotos, folhas, flores, caules, galhos, raízes e sementes e são armazenados em células secretoras, epidérmicas e tricomas. Devido a sua rica composição química, dentre os principais são: terpenoides, alcaloides e cumarinas. Os óleos essenciais têm ganhado cada vez mais notoriedade e despertado interesse, dentre pesquisadores do mundo todo, devido as suas inúmeras propriedades (RESCHKE; MARQUES e MAYWORM, 2007).

O presente trabalho objetivou, por meio de ensaios *in vitro*, comparar a Concentração Inibitória Mínima do extrato aquoso e do extrato etanólico de *Rhaphiodon echinus* (Lamiaceae) contra cepas de *Candida tropicalis*, para determinar a menor concentração do composto capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico.

METODOLOGIA

Ensaio *in vitro*

Substância-teste

Para os ensaios desta pesquisa foram utilizados os extratos aquoso e etanólico das partes aéreas de *Rhaphiodon echinus*, que foram cedidos pela equipe da Prof^a. Dr^a. Gabriela Lemos de Azevedo Maia, da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF).

Os extratos foram conservados em frasco de vidro âmbar e mantidos sob-refrigeração. As emulsões dos extratos nas diferentes concentrações foram preparadas no momento de execução dos ensaios utilizando dimetilsulfóxido (DMSO), Tween 80 (INLAB/Indústria Brasileira) e quantidade suficiente para 3 mL de água destilada estéril.

O mesmo preparo foi realizado com o extrato etanólico em outro tubo de ensaio. E através de diluições em água destilada ou no próprio meio de cultura foram obtidas as concentrações desejadas de ambos os extratos.

Espécies Fúngicas

Foram utilizadas quatro cepas de *Candida tropicalis*, uma cepa padrão: ATCC 13803, e três cepas clínicas: LM 14, LM 31 e LM

36, previamente isoladas, identificadas e gentilmente cedidas pelo Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal da Paraíba, sob a direção da Prof^a. Dr^a Edeltrudes de Oliveira Lima.

Todas as cepas foram mantidas em ágar Sabouraud dextrose (ASD) a uma temperatura de 4°C, sendo utilizados para os ensaios repiques de 24 horas em ASD incubados a 35 °C. No estudo da atividade antimicrobiana foi utilizado um inóculo fúngico de aproximadamente 10⁶ UFC/mL padronizado de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland[9].

Meios de cultura

Foi utilizado o meio ágar Sabouraud dextrose - ASD (Difco Lab., USA) para manutenção dos micro-organismos; preparados conforme as instruções do fabricante.

Fármaco antifúngico

Foi utilizado como antifúngico padrão (controle positivo), a nistatina em pó (Pharma Nostra, Rio de Janeiro). As soluções foram preparadas no momento de execução dos testes, para alcance das concentrações desejadas.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As Concentrações inibitórias mínimas dos extratos aquoso e etanólico de *Rhaphiodon echinus* foram determinadas pela técnica de microdiluição em caldo (CLEELAND & SQUIRES, 1995).

Foram utilizadas placas de 96 orifícios estéreis e com tampa. Em cada orifício da placa, foi adicionado 100 µL do meio líquido Caldo Sabouraud Dextrose (CSD) duplamente concentrado. Em seguida, 100 µL da emulsão do extrato na concentração inicial de 2048 µg/mL (também duplamente concentrado), foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa.

Por meio de uma diluição seriada em razão de dois, foram obtidas as concentrações de 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 e 4 µg/mL, de modo que na primeira linha da placa encontra-se a maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim, foram adicionados 10 µL do inóculo das espécies fúngicas nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica, especificamente.

Um controle de micro-organismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100 µL do mesmo CSD duplamente concentrado, 100 µL de água destilada estéril e 10 µL do inóculo de cada espécie. Para verificar a ausência de interferência nos resultados pelos solventes utilizados na preparação da emulsão, no caso o DMSO (dimetilsulfóxido) e o Tween 80, foi feito um controle no qual foram colocados nas cavidades 100 µL do caldo duplamente concentrado, o DMSO (5%), o Tween 80 (2%) e 10µL da suspensão fúngica. Um controle de esterilidade do meio também foi realizado, onde foi colocado 200 µL do CSD em um orifício sem a suspensão dos fungos.

As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a 35°C por 24 - 48 hs para ser

realizada a leitura. A CIM para os extratos e antifúngico foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico verificado nos orifícios quando comparado com o crescimento controle. Os experimentos foram realizados em duplicata.

RESULTADOS

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é referida como a menor concentração de uma substância teste capaz de inibir o crescimento microbiano de maneira visível.

A CIM₅₀ é dita como a menor concentração capaz de inibir 50% das cepas durante o experimento; seguindo a premissa, observa-se que o extrato aquoso apresentou uma CIM₅₀ de 1024 µg/ML (tabela 1). A CIM₅₀ do extrato etanólico para *Candida tropicalis* foi de 512 µg/ML (tabela 2).

A menor CIM do extrato aquoso de *Rhaphiodon echinus* (Lamiaceae) foi de 256 µg/mL, para a cepa LM 31. A cepa LM 36 obteve CIM igual 512 µg/mL, enquanto as cepas ATCC 13803 e LM 14 apresentaram padrão igual de resposta frente ao composto testado (1024 µg/mL) (Tabela 1).

A menor CIM do extrato etanólico de *Rhaphiodon echinus* (Lamiaceae) foi de 256 µg/mL, para a cepa LM 31. A cepa LM 36 e LM 14 obtiveram CIM igual 512 µg/mL, enquanto a cepa ATCC 13803 apresentou valor de CIM igual à 1024 µg/mL (Tabela 2).

Tabela 1 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL do extrato aquoso de *Rhaphiodon echinus* contra cepas de *Candida tropicalis*.

Cepa Fúngica	CIM	Controle positivo	Controle negativo
ATCC 13803	1024 µg/ML	+	-
LM 14	1024 µg/mL	+	-
LM 31	256 µg/mL	+	-
LM 36	512 µg/mL	+	-

(-) = não houve inibição visível da cepa (+) = inibição visível da cepa **Fonte:** Autoria própria

Tabela 2 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL do extrato etanólico de *Rhaphiodon echinus* contra cepas de *Candida tropicalis*.

Cepa Fúngica	CIM	Controle positivo	Controle negativo
ATCC 13803	1024 µg/ML	+	-
LM 14	512 µg/mL	+	-
LM 31	256 µg/mL	+	-
LM 36	512 µg/mL	+	-

(-) = não houve inibição visível da cepa (+) = inibição visível da cepa **Fonte:** Autoria própria

DISCUSSÃO

Segundo Sartoratto (2004), o potencial antifúngico é dito forte quando a CIM atinge valores inferiores a 500 µg/mL, moderado entre 600 µg/mL – 1500 µg/mL e considerado fraco quando os valores da CIM ultrapassarem 1500 µg/mL.

O extrato etanólico de *Rhaphiodon echinus* demonstrou forte atividade antifúngica sobre as cepas de *Candida tropicalis* visto que obteve CIM₅₀ igual a 512 µg/mL. O extrato aquoso demonstrou moderada atividade

antifúngica sobre as cepas de *Candida tropicalis* visto que obteve CIM₅₀ igual a 1024 µg/mL

Pesquisas de Córdova et al. (2016) revelaram susceptibilidade de cepas de *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. faecalis* e *C. albicans* para o extrato hexânico de outra espécie vegetal pertencente à família *Lamiaceae*, a *S. apiana*. E pela primeira vez, a atividade antibacteriana e antifúngica *in vitro* desse monoterpeno é relatada contra patógenos de relevância clínica.

Asdadi et al. (2015) verificaram as propriedades antifúngica e antioxidante a dos extrato de *Vitex agnus castus* (espécie vegetal pertencente à família *Lamiaceae*) contra cepas de *Candida*, utilizando dentre os métodos, a microdiluição em caldo. Os resultados deste estudo mostraram que estes óleos exibem atividade antifúngica significativa contra fungos selecionados.

Duarte et al. (2016) testaram as propriedades moduladoras do óleo essencial de *R. echinus* quando associado a antimicrobianos, contra cepas fúngicas de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e cepas bacterianas de *E. coli*, *S. aureus* e *Pseudomonas*.

No estudo foi observada uma baixa atividade antifúngica e antibacteriana do óleo essencial, mas um forte efeito modulador quando associado aos antimicrobianos. Segundo os pesquisadores, o óleo essencial também apresenta uma forte atividade quelante de ferro.

Costa et al. (2017) verificaram o potencial antifúngico dos extratos de *R. echinus* contra cepas de diferentes espécies de *Candida* e observaram o efeito modulador destes extratos quando associados a antifúngicos sintéticos.

Pio et al (2018) realizou um levantamento sobre os conhecimentos e usos de plantas medicinais dos habitantes das ilhas do rio São Francisco. *R. echinus* apresentou-se como a planta, cujos efeitos e propriedades, eram mais conhecidos e usados corretamente pela população.

No mesmo estudo foram avaliados os efeitos antimicrobianos dos extratos aquoso e etanólico de *R. echinus* por meio da técnica de microdiluição, contra cepas bacterianas.

Foi possível observar que o extrato aquoso não apresentou efeito desejável sobre as cepas bacterianas, entretanto o extrato etanólico de *R. echinus* apresentou efeito moderado. A fração acetato de etila do extrato etanólico, apresentou forte potencial antibacteriano sobre as cepas estudadas.

CONCLUSÃO

Portanto, com base nos resultados obtidos pode-se perceber que o do extrato aquoso e etanólico de *Rhaphiodon echinus* Ness Mart. Schauer (Lamiaceae) apresenta um forte efeito antifúngico contra cepas de *C. tropicalis*. Desta forma, sugere-se que este composto pode ser utilizado como uma alternativa terapêutica para o combate de infecções causadas por esse fungo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos companheiros do Laboratório de fitoterapia, bioquímica e microbiologia da UFCG (LAFBIM – UFCG) pelo incentivo e grande apoio com a manipulação do material para a realização deste trabalho, ao Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas (UFPB), sob a direção da Prof^a. Dr^a Edeltrudes de Oliveira Lima, por nos ter cedido os fungos do estudo; à equipe da Prof^a. Dr^a. Gabriela Lemos de Azevedo Maia (UNIVASF) por ceder os extratos aquoso e etanólico das partes aéreas de *Raphiodon echinus* e ao Prof^o. Dr^o. Abrahão Alves de Oliveira Filho, pela orientação e confiança.

REFERÊNCIAS

- ASDADI, A. et al. Study on chemical analysis, antioxidant and in vitro antifungal activities of essential oil from wild *Vitex agnus-castus* L seeds growing in area of Argan Tree of Morocco against clinical strains of *Candida* responsible for nosocomial infections. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 25, n. 4, p. e118-e127, 2015.
- BRAZ FILHO, Raimundo. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.
- CANUTO, Mar Masiá; RODERO, Félix Gutiérrez. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 9, p. 550-563, 2002.
- CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections. In: Lorian, V. M. D. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. New York: Willians & Wilkins, p. 739-788, 1991.
- CÓRDOVA-GUERRERO, I. et al. Actividad antibacteriana y antifúngica de un extracto de *Salvia apiana* frente a microorganismos de importancia clínica. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 48, n. 3, p. 217-221, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754116300487>>. Acesso em: 31 ago. 2018.
- COSTA, A. R.; DE LIMA SILVA, J.; LIMA, K. R. R. et al. *Rhaphiodon echinus* (Nees & Mart.) Schauer: Chemical, toxicological activity and increased antibiotic activity of antifungal drug activity and antibacterial. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p. 280-286, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401016306878?via%3Dihub>>. Acesso em: 31 ago. 2018.
- CRISSEY, J. T.; LANG, H.; LAWRENCE C. **Manual of medical mycology**. Cambridge, Mass., USA: Blackwell Scientific, 1995.
- DUARTE, A. et al. Antimicrobial Activity and Modulatory Effect of Essential Oil from the Leaf of *Rhaphiodon echinus* (Nees & Mart) Schauer on Some Antimicrobial Drugs. **Molecules**, v. 21, n. 6, p. 743, 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/21/6/743>>.
- FERREIRA, H. D. Morphology, taxonomy, phylogeny, leaf anatomy and fitoquímica species of the genus *Hyptis* Jacq. (Labiatae) occurring in Goiás and Tocantins. 2010. 483 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.
- HARLEY, R. M. Checklist and key of genera and species of the Lamiaceae of the Brazilian Amazon. **Rodriguésia**, v. 63, n. 1, p. 129-144, 2012.
- PAULA, C. R. Candidíases. **Compêndio de micologia médica**. Rio de Janeiro: Medsi, p. 99-107, 1998.
- PIO, I. D. S. L. et al. Traditional knowledge and uses of medicinal plants by the inhabitants of the islands of the São Francisco river, Brazil and preliminary analysis of *Rhaphiodon echinus* (Lamiaceae). **Braz. J. Biol.**, São Carlos, 2018. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842018005011102&lng=en&nrm=iso>. access on 30 Aug. 2018. Epub Apr 19, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.177447>.
- RESCHKE, A.; MARQUES, L. M.; MAYWORM, M. A. S. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (Moraceae). **Rev. Bras. Plant Med**, v. 9, p. 67-70, 2007.
- SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.
- ZHAN, Jinbiao; ZHOU, Peiheng. A simplified method to evaluate the acute toxicity of ricin and ricinus agglutinin. **Toxicology**, v. 186, n. 1-2, p. 119-123, 2003.

José Lucas Soares Ferreira

Acadêmico do Curso de Odontologia da
Universidade Federal de Campina Grande
(UFCG)

Joyce Natielle Miranda Cavalcante

Acadêmica do Curso de Odontologia da
Universidade Federal de Campina Grande
(UFCG)

Daniele de Souza Siqueira

Acadêmica do Curso de Odontologia da
Universidade Federal de Campina Grande
(UFCG)

Raquel Vieira Bezerra

Acadêmica do Curso de Odontologia da
Universidade Federal de Campina Grande
(UFCG)

Letícia Ataíde Delgado

Cirurgiã-Dentista pela Universidade Federal de
Campina Grande (UFCG)

Heloísa Mara Batista Fernandes de Oliveira

Mestra em Produtos Naturais e Sintéticos
Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba
(UFPB)

Eric de Souza Soares Vieira

Mestrando em Ciências da Saúde pela
Universidade do Vale do São Francisco
(UNIVASF)

Gabriela Lemos de Azevedo Maia

Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos
Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba
(UFPB)

Edeltrudes de Oliveira Lima

Doutora em Farmácia pela Universidade Federal
de São Paulo (USP)

Abrahão Alves de Oliveira Filho

Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos
Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba
(UFPB)

Professor Adjunto do Curso de Odontologia da
Universidade Federal de Campina Grande
(UFCG)

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos após os testes, pode-se observar que:

- Os extratos de *R. echinus* são eficazes contra as cepas de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*;
- Mais estudos são necessários para desvendar o mecanismo de ação da atividade antifúngica destes produtos naturais.

ANEXOS

ANEXO 1

Normas de submissão do International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research

MANUSCRIPT FORMAT

All manuscript should be in MS WORD.

- Language: English
- Space: 1.5
- Paper Size: A4 (8.5"X11")
- Margins: 1 Inch (All sides)

MANUSCRIPT ORGANIZATION

It should be arranged in the following order:

	Contents		Text	
	Sequence	Font Type	Font Size	Pattern
1	Title	Times New Roman	14	Bold
2	Author's Name	Times New Roman	12	Normal
3	Affiliation	Times New Roman	10	Normal
4	Abstract	Times New Roman	12	Normal
5	Keywords	Times New Roman	12	Normal
6	Introduction	Times New Roman	12	Normal
7	Materials and Methods	Times New Roman	12	Normal
8	Result	Times New Roman	12	Normal
9	Discussion	Times New Roman	12	Normal
10	Conclusion	Times New Roman	12	Normal
11	Acknowledgment	Times New Roman	12	Normal
12	Reference	Arabic numerals	12	Normal
	Headings	Times New Roman	12	Bold
	Sub headings	Times New Roman	12	Bold
	Body Text	Times New Roman	12	Normal

Title

The title should be brief, comprehensive and descriptive.

Authorship

Each author must provide their full name including their first name and surname followed by their address. The Corresponding Author of the manuscript must be mentioned the star mark in superscript and should be mentioned the authors affiliation. In addition the corresponding author must include telephone, fax and E-mail address at the bottom left corner of the title page.

Abstract Should start on a new page after the title page to distinguish it from the Introduction. Abstracts should briefly reflect all aspects of the study. The abstract should not exceed 250 words. Review Articles, Research papers and Short Communications should also have an Abstract.

Keywords

Below the abstract, mention 4-6 keywords suitable for indexing. These terms will be at the end of the abstract. If possible, keywords should be selected from Index Medicus or Excerpta Medica Index.

Introduction

It should start on a new page and clearly indicate Aim, Review of Literature and Objective of the research.

Materials & Methods

This section should describe the materials and methods used in the study such as year, site and other relevant details. The statistical method and the level of significance chosen should be stated. Include particulars of ethical approval in this segment (if any).

Result & Discussion

The section should focus on the accomplishment of objectives as mentioned in the introduction part. It should contain a critical review of results of the study.

Conclusion

This section should contain only significant outcomes of the research.

Acknowledgement

All acknowledgments should be typed in one paragraph prior to the reference section (All persons who have made significant contributions to the research work should be included in Acknowledgment).

Reference

The Vancouver Style is the citation style used by scientific journals. It came out of a meeting of medical journal editors in 1978, held in Vancouver, BC, and is maintained by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE).

Books

Author Surname Initials. Title: subtitle. Edition (if not the first). Place of publication: Publisher: Year.

Example:

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Pharmacology. 5th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2003.

Journals

Author Surname Initials. Title of article. Title of journal, abbreviated. Date of Publication: Volume Number(Issue Number): Page Numbers.

Example:

John JC. ACE inhibitors and NSAIDs. Med J Euro. 2010;777:181-195.

Websites

Author Surname Initials (if available). Title of Website [Internet]. Place of publication: Publisher; Date of First Publication [Date of last update; cited date]. Available from: URL

Example:

George Samsung, Rosy Chris. HIV. MediNet. 1/15/2004.

Available from: <http://www.health.com/article.htm>

ANEXO 2

Normas de submissão da Revista UNINGÁ

Diretrizes para Autores

Normas ABNT (citações e referências)

Enviar arquivo no word, contendo título em português e inglês, resumo e abstract, e o texto do corpo do artigo.

As figuras, tabelas, gráficos, legendas e referências deverão incluídas no arquivo do word.

Neste arquivo do word que será feito upload, não adicionar nenhuma informação dos autores (nome, qualificação, endereço, e-mail)

ATENÇÃO: enviar o artigo sem nenhuma identificação dos autores!!!

ANEXO 3

Normas de submissão da Revista UNINCOR

Diretrizes para Autores

Orientações para a formatação de artigos a serem submetidos à Revista da Universidade Vale do Rio Verde

Formatação da página: folha A4. Margens: esquerda, direita, superior e inferior de 2 cm

Título e subtítulo: fonte Times New Roman, tamanho 14, em negrito e centralizados. Devem ser separados entre si por dois pontos.

Autores: nome(s) do(s) autor(es) em fonte Times New Roman, tamanho 10; vinculação profissional e e-mail em fonte Times New Roman, tamanho 9, alinhados à esquerda.

Resumo: fonte Times New Roman, tamanho 10, justificado, com espaçamento simples. Os artigos deverão ser acompanhados de resumos constituído de parágrafo único em português, com cerca de 150 a 250 palavras; cinco palavras-chave separadas por ponto e finalizadas por ponto. O resumo em inglês (Abstract), com cerca de 150 a 250 palavras; cinco palavras-chave (Keywords) separadas por ponto e finalizadas por ponto.

Corpo do trabalho: fonte Times New Roman, tamanho 11, justificado, com espaçamento de 1,5 entre linhas. Texto formatado em 2 colunas.

Referências e citações: as referências devem ser digitadas com fonte Times New Roman, tamanho 10, alinhadas à esquerda, com espaçamento simples e separadas entre si por um espaço em branco. Devem ser apresentadas em ordem alfabética e conter todos os dados necessários à sua identificação, conforme as normas NBR 6023:2002. As citações deverão seguir a NBR 10520:2002 utilizando o sistema autor/data.

Notas: devem ser reduzidas ao mínimo necessário e apresentadas ao final do texto numeradas seqüencialmente.

Ilustrações: devem apresentar títulos em fonte Times New Roman, tamanho 10. A identificação aparece na parte superior precedida da palavra designativa (diagramas, gráficos, fotografias, quadros, figuras, entre outros), seguida de seu número de ocorrência no texto (algarismos arábicos), travessão e o respectivo título. A indicação da fonte aparece na parte inferior mesmo que seja de produção do próprio autor.

Tabelas: fonte Times New Roman, tamanho 10. A identificação aparece na parte superior precedida da palavra designativa (tabela), seguida de seu número de ocorrência no texto (algarismos arábicos), travessão e o respectivo título. A indicação da fonte aparece na parte inferior mesmo que seja de produção do próprio autor..

Recomendações: recomenda-se que se observem as seguintes normas da ABNT:

NRB 5892:1989 - Norma para datar;

NBR 6022:2003 - Artigo em publicação periódica impressa;

NBR 6023:2002 - Referências;

NBR 6024:2003 - Numeração progressiva das seções de um documento escrito;

NBR 6028:2003 - Resumo;

NBR 10520:2002 - Citações em documentos.