



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOGNÓSTICA E AVALIAÇÃO  
ANTIFÚNGICA DAS FOLHAS DE *Chrysobalanus icaco* (Lin)  
EM ESPÉCIES DE *Candida*.**

Ana Regina Maués Noronha Peres

BELÉM - PA

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOGNÓSTICA E AVALIAÇÃO  
ANTIFÚNGICA DAS FOLHAS DE *Chrysobalanus icaco* (Lin)  
EM ESPÉCIES DE *Candida*.**

Autora: Ana Regina Maués Noronha Peres

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcieni Ataíde de Andrade

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta Chagas Monteiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM - PA

2012

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**Biblioteca do Instituto de Ciências da Saúde – UFPA**

---

Peres, Ana Regina Maués Noronha.

Caracterização farmacognóstica e avaliação antifúngica de *Chrysobalanus icaco* (Lin) frente a espécies de *Candida* / Ana Regina Maués Noronha Peres; orientadora, Marcieni Ataíde de Andrade; co-orientadora, Marta Chagas Monteiro — 2012.

111 fls.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia. Belém, 2012.

1. Farmacognosia – análise. 2. Plantas medicinais - Atividade antifúngica. 3. *Chrysobalanus icaco*. 4. Candidíase. I. Título.

CDD:22. ed.: 615.321

---

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Regina Maués Noronha Peres

### **CARACTERIZAÇÃO FARMACOGNÓSTICA E AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA DAS FOLHAS DE *Chrysobalanus icaco* (Lin) EM ESPÉCIES DE *Candida*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas; Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Aprovada em: 12/09/2012

#### **Banca Examinadora**

---

Profª Drª Ana Cristina Baetas / UFPA

---

Profª Drª Marta Chagas Monteiro / UFPA  
Co-orientadora

---

Profª Drª Marcieni Ataíde de Andrade / UFPA  
Orientadora

## DEDICATÓRIA

Deus, que toda honra e glória seja declarada a ti, pelo teu amor inigualável e inesgotável, que tem sido meu alicerce em todas as horas e por toda minha vida. Tudo o que tenho e que sou, que terei e virei a ser, devo somente a Ti, Senhor.

Ao meu amado esposo, Amiraldo Peres, por todo amor, carinho, paciência, compreensão e apoio. Sua presença foi fundamental para a realização deste sonho. Obrigada por estar ao meu lado, tua mão na minha mão, te amo.

Ao meu filho amado, Gustavo, meu presente de Deus, por ter entendido e suportado minha ausência e me amado mesmo assim.

Aos meus pais, irmãos e toda família que torceram e me ajudaram na conquista de mais uma vitória, amo profundamente vocês.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua proteção e amparo. Sem sua presença e amor não conseguiria transformar os espinhos em flores e as pedras do caminho em degraus para que possa a cada dia, estar mais perto de Ti;

À minha família, pelo amor incondicional em momentos especiais quando estive ausente;

Ao meu esposo, Amiraldo, que bom que você existe na minha vida. A sua torcida e amor foram fundamentais para a realização deste projeto;

Ao meu filho Gustavo, louvo a Deus pela sua existência. A sua compreensão e sacrifícios foram surpreendentes;

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marcieni Ataíde de Andrade, obrigada pela sugestão do tema, pela orientação, respeito, paciência e sensibilidade em momentos críticos da construção deste trabalho;

À minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marta Chagas Monteiro, obrigada pela atenção, dedicação e ensinamentos dispensados. As suas críticas foram transformadoras em minha vida;

À Universidade Federal do Pará e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo incentivo e oportunidade de aprendizado e enriquecimento profissional;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPA, pelos valiosos ensinamentos;

Ao Prof. Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa por ter cedido o LAFQ para realização de parte deste trabalho, pelas orientações quanto às práticas laboratoriais. Obrigada pela amizade;

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Roseane Maria Ribeiro Costa, por gentilmente de cedido o Laboratório de Controle de Qualidade e Medicamentos;

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Fâni Dolabela, por ter me adotado desde o início, pelas palavras confortadoras e por ter me abençoado todas as vezes que nos encontrávamos casualmente;

Aos professores, Dr<sup>a</sup> Ana Cristina Baetas e Dr. Francisco Teixeira, por todas as sugestões no momento da qualificação, que contribuíram grandemente na qualidade deste trabalho;

À Profª Drª Maurimélia Mesquita, pelo carinho e contribuição na identificação das espécies;

Ao farmacêutico e amigo, Jailton Nascimento, obrigado por tudo e principalmente pela coragem, luta e otimismo. Sempre me lembrarei de você como um exemplo de perseverança diante da vida e pedirei a Deus que lhe fortaleça a cada dia;

À Dayse Brandão, a sua amizade foi imprescindível nesta caminhada. Obrigada pela sua disposição em me ajudar em meio a tantos compromissos;

Ao João Paulo de Bastos Silva por ter me auxiliado nos momentos mais difíceis. Se Deus não lhe enviasse, esta jornada talvez não se cumprisse;

À Cliciane Melo e Maria Brasília, sentirei muitas saudades das conversas, do apoio, da amizade. Que Deus abençoe as suas vidas, tanto quanto me abençoaram;

Aos meus pacientes, pessoas queridas e fiéis, que entenderam minha ausência durante todo este período e que estão ansiosos pela minha volta. Obrigada pelo carinho;

Aos amigos, que ganhei e que foram extremamente importantes na concretização deste sonho;

Muito obrigada!

“Atingir o alvo é difícil, manter a posição é mais, avançar no alvo mais ainda, contudo a fé em Deus nos faz vencer todas as etapas e chegar no lugar que Ele projetou para nossas vidas”.

**Autor desconhecido**

## **RESUMO**

**PERES, A.R.M.N. Caracterização farmacognóstica e avaliação antifúngica das folhas de *Chrysobalanus icaco* Lin em espécies de *Candida*. 2012. 111fls. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2012.**

Atualmente, a Candidíase tem se destacado dentre as infecções fúngicas, pela sua alta incidência e mortalidade. Paralelamente, há maior registro de resistência microbiana e de falhas terapêuticas apresentadas pelos antifúngicos disponíveis. *Chrysobalanus icaco* Lin, espécie nativa da Amazônia, tem sido usado popularmente em micoses, sem comprovação científica, por isso a importância de pesquisas que avaliem suas propriedades antifúngicas. A análise farmacognóstica das folhas do *C. icaco* indicou teores de perda por dessecação, de cinzas totais e de cinzas insolúveis de  $12,3\% \pm 0,0288$ ;  $4,31\% \pm 0,0001$  e  $1,67\% \pm 0,0012$ , respectivamente. A abordagem fitoquímica do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. icaco* (EHCi) revelou a presença de ácidos orgânicos, açúcares redutores, saponinas, catequinas, depsídeos, fenóis, flavonóides, taninos, proteínas, purinas e aminoácidos. Na análise por CLAE, o mesmo apresentou predomínio de flavonóides, com destaque para Miricetina. Sua atividade antifúngica foi testada por microdiluição em caldo frente à cepa ATCC 40175 de *Candida albicans* e onze isolados clínicos bucais de *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. A CIM variou de maior de 6,25 mg/mL a 1,5 mg/mL e a CFM, quando determinada, foi igual ou maior que 6,25 mg/mL. O EHCi apresentou moderada atividade frente à cepa ATCC 40175 e fraca atividade antifúngica frente aos isolados clínicos bucais. Estes resultados abrem perspectivas para novos estudos que investiguem frações e substâncias de *Chrysobalanus icaco* com maior atividade frente a espécies de *Candida*.

**Palavras-chave:** Análise farmacognóstica, Atividade antifúngica, Candidíase, *Chrysobalanus icaco*.

## ABSTRACT

**PERES, A.R.M.N. Pharmacognostic antifungal and evaluation of leaves *Chrysobalanus icaco* Lin in *Candida* species. 2012. 111fls. Dissertation (Master's degree) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2012.**

Currently, Candidiasis has stood out among fungal infections, due to its high incidence and mortality. In parallel, there is a greater record of microbial resistance and therapeutic failures presented by antifungals available. *Chrysobalanus icaco* Lin, a species native to the Amazon, has been popularly used in mycoses, without scientific evidence, so the importance of research to evaluate their antifungal properties. The analysis pharmacognostic of leaves of *C. icaco* indicated levels of loss on drying, total ash and ash insoluble  $12.3\% \pm 0.0288$ ,  $4.31\% \pm 1.67\% \pm 0.0001$  and  $0.0012$ , respectively. Phytochemical screening of the hydroalcoholic extract of the leaves of *C. icaco* (EHCI) revealed the presence of organic acids, sugars, saponins, catechins, depsídeos, phenols, flavonoids, tannins, proteins, amino acids and purine. In HPLC analysis, it was dominated by the flavonoids, especially Myricetin. Antifungal activity was tested by microdilution opposite strain ATCC 40175 *Candida albicans* and eleven clinical isolates of oral *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*. The MIC ranged from greater than 6.25 mg / mL to 1.5 mg / mL and CFM, when determined, was equal to or greater than 6.25 mg / mL. The EHCI showed moderate activity against the strain ATCC 40175 and the weak antifungal activity against clinical isolates mouth. These results open new perspectives for studies that investigate fractions and substances *Chrysobalanus icaco* with greater activity against *Candida* species.

**Keywords:** Analysis pharmacognostic, Antifungal activity, Candidiasis, *Chrysobalanus icaco* L; hydroalcoholic.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Aspectos gerais de distribuição em arbusto de <i>Chrysobalanus icaco</i> L.....	32
Figura 2 -	Aspecto das folhas de <i>Chrysobalanus icaco</i> L.....	34
Figura 3 -	Imagens dos frutos e semente de <i>Chrysobalanus icaco</i> L.....	35
Figura 4 -	Imagens das flores de <i>Chrysobalanus icaco</i> L.....	35
Figura 5 -	Estruturas químicas encontradas em <i>Chrysobalanus icaco</i> L.....	37
Figura 6 -	Exsicata de <i>Chrysobalanus icaco</i> L enviada para identificação botânica.....	44
Figura 7 -	Tamisador usado para análise granulométrica de <i>Chrysobalanus icaco</i> L. com a indicação da posição do número de cada tamis em µm (micrômetros).....	46
Figura 8 -	Seqüência de passos da perda por dessecação pelo método de gravimetria.....	48
Figura 9 -	Medição do pH de <i>Chrysobalanus icaco</i> L através de potenciômetro de bancada.....	50
Figura 10 -	Seqüência de passos na determinação do teor de cinzas totais.....	51
Figura 11 -	Seqüência para determinação do resíduo seco.....	53
Figura 12 -	Condições de armazenamento dos isolados de <i>Candida sp</i> ....	62
Figura 13 -	Ajuste do inóculo fúngico à escala 0,5 de McFarland.....	62

Figura 14 -	Diluição dos inóculos fúngicos em caldo Mueller Hinton.....	63
Figura 15 -	Esquema de diluições e concentrações finais de EHCi.....	64
Figura 16 -	Disposição de EHCi em triplicata nas concentrações de 6,25 mg/mL (linha A); 3,12 mg/mL (linha B); 1,56 mg/mL (linha C); 0,78 mg/mL (linha D); 0,39 mg/mL (linha E); 0,19 mg/mL (linha F); Cc: 200 µL de inóculo: controle de crescimento; C+: Nistatina a 50.000 UI/mL e C-: DMSO a 2,5%.....	64
Figura 17 -	Microdiluição da ATCC 40175 de <i>Candida albicans</i> após uso de MTT.....	65
Figura 18 -	Análise granulométrica do pó das folhas de <i>Chrysobalanus icaco</i> .....	69
Figura 19 -	Espectro de UV do pico 01, mostrando os máximos de absorção característicos de flavonóides (253 e 355 nm).....	78
Figura 20 -	Cromatograma do EHCi, mostrando pico de Miricetina (pico 01)..	79
Figura 21-	Padrão de crescimento de <i>Candida tropicalis</i> (C1) frente ao EHCi a 6,25 mg/mL (A), ao Controle Negativo (B) e ao controle positivo (C).....	82
Figura 22 -	Padrão de crescimento de <i>C. parapsilosis</i> (C2): CIM igual a 3,12 mg/mL(B) e CFM igual a 6,25 mg/mL (A).....	83
Figura 23 -	Crescimento de <i>C. parapsilosis</i> (C10): CIM igual a 6,25 mg/mL(A)...	83
Figura 24 -	Padrão de crescimento de <i>C. parapsilosis</i> (C4): CIM > que 6,25 mg/mL.....	83
Figura 25a-	Crescimento de C11 ( <i>C. dubliniensis</i> ), em três diferentes concentrações expressas em mg/mL.....	84
Figura 25b-	A: Controle Negativo - DMSO a 2,5%; B: Controle positivo - Nistatina 50.000 UI/mL para <i>Candida dubliniensis</i> .....	84
Figura 26 -	<i>Candida albicans</i> (C5) frente ao EHCi com CIM > 6,25 mg/mL.....	85
Figura 27 -	<i>Candida albicans</i> (C3) frente ao EHCi com CIM igual a 6,25 mg/mL e CFM > 6,25 mg/mL.....	85

Figura 28 - *Candida albicans* (C7) frente ao EHCi com CIM igual a 3,12 mg/mL e CFM > 6,25 mg/mL..... 85

Figura 29 - *Candida albicans* (ATCC 40175) nas concentrações de 6,25 mg/mL (A), 3,12 mg/mL (B) e 1,56 mg/mL (C); Controle negativo (C-): DMSO a 2,5% (D) e controle positivo (C+): Nistatina a 50.000 UI/mL (E)..... 86

**LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES**

%	Porcentagem
Atm	Atmosfera
cm	Centímetros
D	Dextro
g	Gramma
g/mL	Gramma por mililitro
GL	Gay-Lousac
h	Hora
m	Metro
mg	Miligrama
min	Minuto
mg/Kg	Miligramas por quilograma
mg/mL	Miligramas por mililitro
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
°	Grau
°C	Graus celsius
p/p	Peso peso
p/v	Peso volume
ppm	Parte por milhão
rpm	Rotações por minuto
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia por mililitro
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrômetro

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média e desvio padrão da densidade de massa e da densidade relativa do decocto expressos em (g/mL) grama por mililitro, do pó das folhas do <i>Chrysobalanus icaco</i> L.....	70
Tabela 2 - Média e desvio padrão da perda por dessecação do pó das folhas do <i>C. icaco</i> obtida após um minuto, em porcentagem (%), usando balança de infravermelho (Infratest).....	72
Tabela 3 - Média e desvio padrão expressos em grama (g) para o teor de extrativos do pó das folhas do <i>Chrysobalanus icaco</i> L.....	74
Tabela 4 - Valores de CIM e CFM expressos em mg/mL para isolados orais e ATCC 40175.....	82

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Resultados das reações indicativas da presença (+) ou a ausência (-) de constituintes químicos de <i>Chrysobalanus icaco</i> L.....	76
Quadro 2 - Classificação das espécies após identificação, segundo ordem de coleta dos isolados orais.....	80

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>Aspectos Epidemiológicos das infecções por <i>Candida</i>.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2</b>	<b>Agentes antifúngicos e a resistência dos microorganismos.....</b>	<b>25</b>
<b>2.3</b>	<b>Plantas medicinais e suas propriedades antifúngicas.....</b>	<b>29</b>
<b>2.4</b>	<b><i>Chrysobalanus icaco</i> Lin.....</b>	<b>32</b>
2.4.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS.....	32
2.4.2	DESCRIÇÃO BOTÂNICA.....	34
2.4.3	COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	36
2.4.4	CARACTERÍSTICAS ETNOFARMACOLÓGICAS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	37
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>40</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Seleção da espécie vegetal.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2</b>	<b>Microrganismos.....</b>	<b>41</b>
<b>4.3</b>	<b>Solventes, reagentes e soluções.....</b>	<b>42</b>
<b>4.4</b>	<b>Equipamentos.....</b>	<b>42</b>
<b>4.5</b>	<b>Procedimentos éticos.....</b>	<b>43</b>
<b>4.6</b>	<b>Coleta e identificação do material botânico.....</b>	<b>43</b>
<b>4.7</b>	<b>Preparo do material botânico.....</b>	<b>44</b>
<b>4.8</b>	<b>Preparo do extrato hidroalcoólico.....</b>	<b>45</b>
<b>4.9</b>	<b>Caracterização farmacognóstica .....</b>	<b>45</b>
4.9.1	ANÁLISE GRANULOMÉTRICA DO PÓ.....	45
4.9.2	DENSIDADE APARENTE.....	47
4.9.3	DENSIDADE DE MASSA E DENSIDADE RELATIVA.....	47
4.9.4	DETERMINAÇÃO DA PERDA POR DESSECAÇÃO.....	48

4.9.4.1	Método Gravimétrico.....	48
4.9.4.2	Dessecação usando balança de infravermelho (Infratest).....	49
4.9.5	DETERMINAÇÃO DO pH.....	49
4.9.6	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS TOTAIS.....	50
4.9.7	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS INSOLÚVEIS EM ÁCIDO.....	51
4.9.8	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE EXTRATIVOS.....	52
4.9.9	DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE ESPUMA.....	52
4.9.10	DETERMINAÇÃO DO RESÍDUO SECO.....	53
4.9.11	ABORDAGEM FITOQUÍMICA.....	53
4.9.11.1	Saponina espumígena.....	54
4.9.11.2	Ácidos orgânicos.....	54
4.9.11.3	Açúcares redutores.....	54
4.9.11.4	Polissacarídeos.....	55
4.9.11.5	Proteínas e Aminoácidos.....	55
4.9.11.6	Fenóis e Taninos.....	55
4.9.11.7	Flavonóides.....	55
4.9.11.8	Alcalóides.....	56
4.9.11.9	Glicosídeos cardiotônicos.....	56
4.9.11.10	Purinas.....	56
4.9.11.11	Catequinas.....	57
4.9.11.12	Sesquiterpenolactonas e outras lactonas.....	57
4.9.11.13	Esteróides e triterpenóides.....	57
4.9.11.14	Carotenóides.....	58
4.9.11.15	Depsídeos e depsidonas.....	58
4.9.11.16	Derivados da Cumarina.....	58
4.9.11.17	Antraquinonas.....	59
<b>4.10</b>	<b>Análise do EHCi por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....</b>	<b>59</b>
<b>4.11</b>	<b>Obtenção dos Isolados Clínicos Orais.....</b>	<b>59</b>
4.11.1	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	60
4.11.2	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	60
<b>4.12</b>	<b>Atividade antifúngica de ECHi frente a isolados clínicos e cepas ATCC de <i>Candida spp</i>.....</b>	<b>60</b>

4.12.1	PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE (SE) DE EHCi.....	61
4.12.2	PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA.....	61
4.12.3	PREPARO DOS INÓCULOS FÚNGICOS.....	61
4.12.4	TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO EM PLACAS PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	63
4.12.5	DETECÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.(CIM).....	65
4.12.6	CONTAGEM DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA.(CFM).....	65
<b>4.13</b>	<b>Análise Estatística.....</b>	<b>66</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>5.1</b>	<b>Coleta e preparo da exsicata para identificação botânica.....</b>	<b>67</b>
<b>5.2</b>	<b>Preparo do material vegetal.....</b>	<b>67</b>
<b>5.3</b>	<b>Processamento da amostra.....</b>	<b>68</b>
<b>5.4</b>	<b>Preparo do extrato hidroalcoólico.....</b>	<b>68</b>
<b>5.5</b>	<b>Caracterização farmacognóstica.....</b>	<b>68</b>
5.5.1	DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DO PÓ.....	68
5.5.2	DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE.....	69
5.5.2.1	Densidade Aparente.....	69
5.5.2.2	Densidade de Massa e Densidade Relativa pelo Método da Picnometria.....	70
5.5.3	DETERMINAÇÃO DE PERDA POR DESSECAÇÃO.....	70
5.5.3.1	Perda por dessecação através de método gravimétrico.....	71
5.5.3.2	Perda por dessecação através de Balança de Infravermelho (Infratest).....	71
5.5.4	DETERMINAÇÃO DO pH DO EXTRATO.....	72
5.5.5	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS TOTAIS.....	73
5.5.6	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS INSOLÚVEIS EM ÁCIDO.....	74
5.5.7	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE EXTRATIVOS.....	74
5.5.8	DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE ESPUMA.....	75
5.5.9	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE RESÍDUO SECO.....	75
<b>5.6</b>	<b>Abordagem Fitoquímica.....</b>	<b>76</b>
<b>5.7</b>	<b>Análise do EHCi por CLAE.....</b>	<b>78</b>
<b>5.8</b>	<b>Distribuição e identificação das leveduras.....</b>	<b>79</b>
<b>5.9</b>	<b>Atividade antifúngica do EHCi.....</b>	<b>81</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>88</b>

<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>89</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>103</b>

## **1 INTRODUÇÃO**

A candidíase é uma infecção fúngica oportunista que tem tido uma maior incidência nas três últimas décadas e cuja importância está relacionada a elevadas taxas de mortalidade e morbidade (AMARAL e BARA, 2005; ZANARDI et al, 2008). Esta doença tem sido responsável por cerca de 80% das infecções micóticas hospitalares, considerada como a principal causa de micoses sistêmicas, com taxa de mortalidade geral de candidemias estimada entre 40% a 60% (COLOMBO e GUIMARÃES, 2003).

As espécies de *Candida*, responsáveis pelas variadas formas de candidíases, vivem de forma comensal nas mucosas da boca e dos tratos digestivo, genital e urinário, de indivíduos saudáveis, e podem desencadear infecções oportunistas, em condições que comprometam o sistema imunológico ou em pessoas com fatores predisponentes (COWEN et al, 2002; HEYDER e SILVA, 2004).

Dentre os sujeitos com alto risco de sofrer infecções fúngicas secundárias, citam-se os transplantados, onco-hematológicos, imunodeprimidos, queimados, portadores de doenças crônico-degenerativas, e recém-nascidos prematuros (SIDRIM et al, 1998; MELLADO et al, 2002; VENKATESAN et al, 2005; GALVÁN e MARISCAL, 2006; MASCHMEYER e HAAS, 2008; SABLE et al, 2008).

Os pacientes portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), imunodeprimidos ou submetidos à quimioterapia do câncer e transplante de órgãos e de sangue, possuem maiores chances de apresentar candidíase oral; entretanto, a mesma também tem sido evidenciada em portadores de próteses bucais, pacientes em uso prolongado de antibióticos, além de pacientes especiais que possuam dificuldades motoras e/ou cognitivas (CAVASSANI et al, 2002; SANTOS et al, 2002; TANGA et al, 2003; CROCCO et al, 2004; MENEZES et al, 2006).

Em relação à maior susceptibilidade dos pacientes às infecções fúngicas, houve aumento de fármacos disponíveis para o tratamento antifúngico, entretanto, os mesmos possuem significativas limitações terapêuticas: baixa biodisponibilidade, evidentes reações adversas, interações medicamentosas e desenvolvimento de resistência pelos microorganismos (ORLANDO, 2005). Com isso, esses e outros

fatores apontam para a necessidade de desenvolvimento de novos antifúngicos que ofereçam menor resistência por parte dos microrganismos, menos efeitos colaterais e que promovam ainda, como marco diferencial, melhor acesso às populações que vivem à margem do mercado consumidor de medicamentos convencionais (SILVA, 2003; CAMPAGNOLI et al, 2004).

Na Amazônia, constata-se que uma grande parte da população ainda possui dificuldade de acesso a medicamentos e serviços de saúde, e que fatores tais como ínfimas condições de higiene e precárias condições sócio-econômicas, tanto quanto características climáticas da região, como elevada temperatura e umidade relativa do ar, pluviosidade alta e densa mata florestal, contribuem para maior susceptibilidade de sua população às infecções micóticas (ARAÚJO et al, 2008; LACAZ, 1998; SILVA et al, 1981).

Especificamente na terapêutica antifúngica, há relatos do uso popular de algumas plantas da região, tanto por motivos culturais quanto por razões sócio-econômicas (JARDIM et al, 2005; MARTINS et al, 2005). Mundialmente, existem várias pesquisas que indicam atividade antifúngica de plantas medicinais, por isso, ressalta-se a importância de mais estudos que determinem prováveis agentes naturais profiláticos e terapêuticos para o tratamento das infecções fúngicas (SMÂNIA, 2003; FENNER et al, 2006). Esta declaração também se fundamenta no fato de que 25% das drogas provêm de plantas, sendo que das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela Organização Mundial de Saúde (OMS), 11% são exclusivamente originárias de plantas (MORAIS e BRAZ-FILHO, 2007).

Entretanto no Brasil, comparada à ampla diversidade de espécies vegetais, ainda há poucas pesquisas farmacológicas, fitoquímicas, etnofarmacológicas e toxicológicas envolvendo plantas reconhecidas por suas propriedades terapêuticas (HEINRICH, 2000; MACIEL et al, 2002; NIERO et al, 2002; ARAÚJO et al, 2004). Além disso, observa-se ainda, que há um déficit de agentes antifúngicos em relação à maior incidência de doenças fúngicas e à resistência oferecida pelos microorganismos (SMÂNIA, 2003; MESA ARANGO et al, 2004). Estas evidências incitam pesquisas para análise da atividade antifúngica de espécies vegetais que contribuam com o desenvolvimento de alternativas terapêuticas de baixo custo, melhor acesso, mais eficazes e com menos reações adversas (SILVA, 2003).

Dentro deste contexto, é imprescindível a avaliação *in vitro* da atividade candidida de extratos vegetais brutos da região Amazônica, assim como a

determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) destes extratos, com propósito de identificar seu potencial antifúngico e contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Aspectos Epidemiológicos das infecções por *Candida*

A candidíase é considerada uma das infecções fúngicas mais frequentes que acometem o ser humano; quando invasiva, é uma das principais causas de mortalidade associada à micose em todo o mundo, ao se disseminar por via hematogênica, é denominada candidemia e/ou fungemia (COLOMBO e GUIMARÃES, 2003; FURLANETO-MAIA et al, 2007; PFALLER e DIEKEMA, 2007). Dentre os fatores que podem estar relacionados à epidemiologia de doenças causadas por *Candida sp*, cita-se a região demográfica, as características da população estudada, causas da infecção e sítio anatômico acometido (PFALLER e DIEKEMA, 2007).

As espécies de *Candida* se apresentam como organismos comensais em indivíduos saudáveis de diversas faixas etárias, e podem tornar-se patógenos oportunistas, dando origem a infecções como a candidíase, que se caracteriza por lesões mucosas superficiais até disseminações sistêmicas graves e invasivas, potencialmente fatais em alguns pacientes (DE REPENTIGNY et al, 2000; CAMPISI et al, 2002). Além disso, as candidíases podem estar envolvidas em lesões endodônticas persistentes e lesões periodontais, onde a espécie mais isolada tem sido *C. albicans*, seguida das espécies *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (SUNDQVIST et al, 1998; SANT'ANA et al, 2002).

Ao longo da década de 1990, foram descobertas cerca de 200 espécies de *Candida*, sendo que apenas 10% destas foram reconhecidas como agentes etiológicos de infecções em seres humanos; das quais, oito foram consideradas patogênicas: *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. viswanathii* e *C. glabrata* (KURTZMAN e FELL, 1998; MCLNTYRE, 2001). Posteriormente, foram conhecidas novas espécies de *Candida* causadoras de micoses superficiais ou invasivas em seres humanos, assim como espécies emergentes como *C. rugosa*, *C. famata*, *C. utilis*, *C. lipolytica*,

*C. norvegensis*, *C. inconspícua* (COLEMAN RINALDI et al, 1998; DIGNANI et al, 2003).

Espécies como *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, além de *C. albicans*, podem ser isoladas em até 80% das mucosas da cavidade oral, vaginal, trato gastrointestinal e região retal de indivíduos saudáveis; quando patogênicas e introduzidas por via intravenosa, podem invadir a corrente sanguínea, causando tromboflebite, endocardite, infecções oculares e infecções em outros órgãos (CAPOOR et al, 2005; LAUPLAND et al, 2005; BASSETTI et al, 2006). Na candidíase vulvovaginal (CVV), cerca de 90% dos casos são atribuídos à *C. albicans*, mas *Candida glabrata* e *C. tropicalis* têm se destacado como agentes etiológicos (SOBEL, 1999).

No Brasil, há poucos registros de estudos relacionados à incidência do gênero *Candida* em amostras clínicas de diversos sítios, comparada à importância que as mesmas possuem. Nesse sentido, relatórios brasileiros sobre hospitais públicos terciários da região Sudeste evidenciam que *C. albicans* é o principal agente de candidemia (20-50%), seguido por *C. parapsilosis* (17-35%), *C. tropicalis* (12-27%) e *C. guilliermondii* (2-10%). Sua maior patogenicidade estaria ligada ao desenvolvimento de fatores de virulência como a troca fenotípica com alteração morfológica celular, à capacidade de adesão a células hospedeiras e à atividade lipolítica e proteolítica extracelular (NAGLIK et al, 2004; SCHALLER et al, 2005). Além da patogenicidade também estar associada a fatores como o uso excessivo de agentes antimicrobianos de amplo espectro, aumento da sobrevivência, terapia antineoplásica agressiva e à epidemia de AIDS (CHATTOPADHYAY et al, 2001; MELO et al, 2004; YANG et al, 2005).

Outros estudos relatam que as fungemias estão relacionadas principalmente às espécies não *albicans* (COLOMBO et al, 1999; BRITO et al, 2006). Em pacientes hospitalizados, *C. parapsilosis*, que frequentemente é encontrada na pele, está amplamente relacionada como causa de fungemias e onicomicoses. Além de apresentar alta incidência em recém-nascidos internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), tendo como principais fatores de risco para sua transmissão, o uso prolongado de cateteres e a aplicação de nutrição parenteral (CLARK et al, 2004; BRILHANTE et al, 2005; CANO et al, 2005; DURÁN et al, 2005; SAN MIGUEL et al, 2005; VALLE et al, 2010).

Estudo realizado em hospital público terciário de Fortaleza reportou *C. parapsilosis* como sendo a principal espécie não *albicans* isolada dos pacientes, sendo que as espécies de *Candida* foram responsáveis por 72% das ocorrências de fungemias nesse hospital (MEDRANO et al, 2006). Outra espécie de importância é *C. tropicalis*, transmitida por via endógena e que parece ser mais virulenta que *C. albicans* em pacientes neutropênicos, com neoplasias e doenças hematológicas e infecção disseminada; apresentando altas taxas de mortalidade (KONTOYANNIS et al, 2001; LEUNG et al, 2002; GOLDANI e MARIO, 2003).

As amostras clínicas mais cultivadas, como sangue, urina e escarro, indicam *Candida albicans* como predominante; porém, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*, importantes patógenos oportunistas, aparecem com prevalências cada vez mais altas (BAUMGARTNER et al, 1996; FLOONGLADDA et al, 2002). Estudo realizado em um hospital público infantil de São Paulo, no período entre 2005 e 2007, constatou que 62,12% das infecções eram ocasionadas por *Candida albicans* e 37,88% por espécies não *albicans*. *Candida albicans* foi mais prevalente em casos de candidúria (53,62%), enquanto que 71,43% espécies não *albicans* prevaleceram em candidemia (FURLANETO-MAIA et al, 2007; VIANI e PAULA, 2008).

Esta mudança no perfil epidemiológico de candidemia estaria relacionada com o aumento de procedimentos médicos invasivos, bem como a profilaxia e uso empírico de antifúngicos, como os azóis (COLOMBO et al, 2002; GOLDANI e MARIO, 2003; ANTUNES et al, 2004; DURÁN et al, 2005). Contudo, independentemente de sua etiologia pertencer ou não a espécies de *Candida albicans*, as infecções causadas por estas, representam importante problema de saúde pública (VALLE et al, 2010). Sua importância, também é consequência da estreita relação que possui com a resistência a múltiplas drogas, com a evolução clínica e seu potencial de letalidade, visto que as infecções fúngicas invasivas são difíceis de diagnosticar, prevenir e tratar (COLOMBO, 2000; NUCCI e COLOMBO, 2002; SILVA, 2003; MORGAN et al, 2005).

## **2.2 Agentes antifúngicos e a resistência oferecida dos microorganismos**

O aumento da sobrevivência de muitos pacientes promoveu a maior susceptibilidade dos mesmos a infecções causadas por organismos de baixa virulência, ou considerados, não patogênicos. Logo, as infecções fúngicas têm apresentado maior incidência e os fungos se apresentam cada dia, mais resistentes às drogas comerciais (ALVES et al, 2006).

Concomitantemente, intensificou-se a busca por novas opções terapêuticas, em virtude não só da resistência oferecida pelos microorganismos, mas pela constatação de que os antifúngicos atualmente disponíveis possuem sérias desvantagens, entre estas, baixo espectro de ação, pouca seletividade e alta toxicidade, causando recidivas pelo efeito fungistático e não fungicida (REX et al, 2000; ZACCHINO et al, 2003; CHEN e SORREL, 2007).

Entre as principais classes de antifúngicos usados na terapêutica antifúngica, citam-se os poliênicos, azóis, alilaminas, 5-fluorocitosina, griseofulvina, entre outros. Especificamente no tratamento das candidíases, destacam-se: os polienos e os azóis (SOBEL, 1999).

O principal representante da classe dos polienos é a Anfotericina B, com ação fungicida, sendo a droga de primeira escolha no tratamento das infecções causadas pelo gênero *Candida*, contudo apresenta efeitos tóxicos e requer administração intravenosa; age nos esteróis, preferencialmente no ergosterol, provocando alteração da integridade da membrana fúngica e desequilíbrio osmótico, o que resulta na perda de potássio intracelular, magnésio, açúcares e de outros metabólitos, promovendo a morte celular (GOODWIN et al, 1995; CHEN e SORREL, 2007). Com intuito de melhorar a farmacocinética e diminuir a toxicidade do fármaco, foram desenvolvidas formulações lipídicas (Ambisome® - Anfotericina B lipossomal), que na sua formulação clássica apresenta estreito índice terapêutico (RINDGEN et al, 1991).

A Nistatina, outro representante dos poliênicos, é considerada demasiadamente tóxica (McGINNIS e RINALDI, 1996). É um antifúngico relativamente insolúvel na água e instável, usado no tratamento de infecções causadas por *Candida* da mucosa, pele e trato intestinal; quando utilizada na forma tópica, é a droga de eleição para o tratamento das infecções da cavidade oral (YAGIELA, 1999; FARIAS et al, 2003). Pode causar leves e transitórios distúrbios gastrointestinais, como náuseas, vômitos e diarreia, além de apresentar um sabor amargo (FARIAS et al, 2003).

Os azóis marcaram uma nova era no tratamento de infecções por *Candida sp*, sendo disponíveis para a administração oral, cujo mecanismo de ação é a inibição da via biosintética do ergosterol na membrana da célula fúngica, em diferentes etapas da cascata de síntese, inibindo principalmente a 14 $\alpha$ -lanosteroldimetilase. A utilização de agentes antifúngicos azólicos foi uma das alternativas encontradas para tratar infecções fúngicas, tanto superficiais quanto sistêmicas, diminuindo a agressividade dos poliênicos. Seus representantes são: cetoconazol, miconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, ravuconazol (VERMITSKY et al, 2006; CHEN e SORRELL, 2007).

O cetoconazol foi o primeiro agente disponível para o tratamento de candidíase mucocutânea, entretanto, foram identificadas falhas terapêuticas associadas aos valores elevados da CIM; posteriormente, o fluconazol, solúvel em água, com biodisponibilidade superior a 90% após administração oral, foi amplamente usado nestas infecções, principalmente em pacientes soropositivos para SIDA, portadores de candidíase orofaríngea (CHEN e SORRELL, 2007). Com o amplo uso desses agentes antifúngicos, tem se observado um crescente aumento na resistência a essas drogas, especialmente ao fluconazol em espécies de *Candida não albicans*, comparada à Anfotericina B (ELLIS, 2002; KRCMERY e BARNES, 2002).

A 5-fluorocitosina é um agente antifúngico com limitado espectro de atividade, atua inibindo o metabolismo das pirimidinas, interferindo na biossíntese de DNA e RNA (WEBSTER e WEBER, 2007). Deve ser utilizado em combinação com outros agentes para prevenir o aparecimento de resistência e possui como reações adversas mais comuns, a supressão da função da medula óssea, disfunção renal, distúrbios gastrointestinais, erupção cutânea, entre outros (PICKERING, 2000).

A terbinafina é um composto fungicida sintético, representante das alilaminas que inibe a biossíntese de ergosterol ao nível da escualeno epoxidase, o que resulta no esgotamento do ergosterol e acumulação tóxica de escualeno, provocando a inibição do crescimento e morte celular. A terbinafina não é normalmente usada isoladamente, mas sim em combinação com outras drogas para o tratamento de espécies de *Candida* resistentes; geralmente é bem tolerada e só raramente ocorrem distúrbios gastrointestinais ou toxicidade cutânea (RODRIGUEZ e PATRICK, 2001; WEBSTER e WEBER, 2007).

Antifúngicos mais recentes da classe das equinocandinas (caspofungina, anidulafungina, micafungina), consideradas por alguns, como penicilinas antifúngicas também têm sido empregadas em infecções fúngicas sistêmicas por *Candida sp.* São substâncias provenientes dos fungos *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus syndowie*, *Zalerion arboricola*, considerados como fungicidas lipopeptídicos cíclicos que atuam prevenindo a síntese da parede celular através da inibição não competitiva da 1,3- $\beta$ -D-glucanosintetase, que sintetiza um componente estrutural importante da parede celular, o  $\beta$ -(1,3)-glucano, enzima que está ausente nas células dos mamíferos e presente na maioria dos fungos (ANDRIOLE et al, 1998; STONE et al, 2002; ODDS et al, 2003). A caspofungina, ao reduzir a síntese da 1,3- $\beta$ -D-glucanosintetase, provoca a perda de glucano na parede celular dos fungos, o que resulta na fragilidade osmótica dos mesmos (RODRIGUEZ e PATRICK, 2001).

Em relação à sensibilidade das espécies de *Candida* aos agentes antimicóticos, observa-se que *C. albicans* é sensível a todos os antifúngicos sistêmicos, mas casos de resistência adquirida a azólicos são conhecidos em pacientes que foram expostos a estes por períodos prolongados. Evidencia-se ainda que *C. dubliniensis* tem mais facilidade em desenvolver resistência aos azólicos em relação à *C. albicans* (SANGLARD e ODDS, 2002).

Os isolados clínicos de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* apresentam sensibilidade à Anfotericina B e aos triazólicos. A espécie *Candida glabrata* apresenta menor sensibilidade à Anfotericina B e ao fluconazol, sendo que 10% das amostras desta espécie recuperadas no sangue apresentam resistência ao fluconazol, possuindo maior ocorrência em pacientes idosos (GODOY et al, 2003).

A espécie *C. krusei* é naturalmente resistente ao fluconazol, e facilmente encontrada em pacientes neutropênicos, expostos ao mesmo; *Candida lusitanae* possui ou desenvolve rapidamente resistência à Anfotericina B, mas é sensível aos triazólicos (KRCMERY e BARNES, 2002).

São reportados casos de resistência *in vitro* de amostras clínicas da espécie *C. guilliermondii* à Anfotericina B, assim como má resposta clínica de pacientes, portanto existem dúvidas sobre a eficácia da Anfotericina B no tratamento de infecções sistêmicas causadas por esta espécie (MERZ, 1984; HAZEN, 1995; DIEKEMA et al, 2002; KRCMERY e BARNES, 2002; SANGLARD e ODDS, 2002; GODOY et al, 2003; GOLDANI e MARIO, 2003).

A resistência de espécies de *Candida* tem tido ampla repercussão pela maior ocorrência e por ter se estendido a vários antifúngicos de uso clínico, tais como, polienos, fluoropirimidinas, azóis, equinocandinas e alilaminas (ARANGO et al, 2004). Dentre os mecanismos de resistência, destacam-se a superprodução de enzimas, a utilização de vias metabólicas alternativas e a produção de bombas de efluxo que expulsam o medicamento da célula fúngica (GOLDMAN et al, 2004; FERREIRA et al, 2005; ESPINEL-INGROFF, 2008).

A crescente resistência dos microorganismos favorece a busca por alternativas terapêuticas e dentro deste contexto os extratos vegetais com comprovada atividade antimicrobiana, constituem-se em alternativas para a descoberta de novos medicamentos antifúngicos, inclusive mais potentes e seguros (LOGUERCIO et al, 2005).

### **2.3 Plantas medicinais e suas propriedades antifúngicas**

O uso de plantas medicinais no tratamento das mais variadas doenças é uma arte milenar que tem inúmeros registros, inclusive bíblicos, que indicam relação direta com o início da existência humana (VEIGA JÚNIOR et al, 2005).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 80% da população mundial utilizam alguma espécie de planta para melhoria ou tratamento de sinais e/ou sintomas de processos patológicos (ANVISA, 2002).

Apesar de sua relevante e ampla utilização por todo o mundo, o uso terapêutico de plantas, ainda caracteriza-se pelo empirismo, oferecendo riscos de reações adversas em virtude do grande potencial toxicológico destas e das interações relacionadas, contrariamente ao que grande parte da população mundial acredita (FERRO, 2006).

Com relação às pesquisas de propriedades antifúngicas, destaca-se o levantamento etnofarmacológico realizado por Fenner et al (2006) que identificou 409 espécies vegetais, distribuídas em 98 famílias, utilizadas no tratamento de infecções fúngicas, contudo estudos farmacológicos que comprovem esta atividade ainda são escassos (CARVALHO, 2007).

Relacionado às pesquisas de atividade anti *Candida* ou candidida, tem-se observado maior registro de investigações quanto às propriedades terapêuticas de óleos essenciais, extratos vegetais e frações (BERTINI et al, 2005; TAMPIERI et al, 2005; POZZATTI, 2007).

Entretanto, devido à complexidade dos mesmos, em virtude da variabilidade de metodologias e a necessidade do controle de qualidade, é importante que mais recursos financeiros e humanos sejam destinados a estas pesquisas, visando não só o registro, mas a reprodutibilidade e aplicação das diversas propriedades destas espécies com fins terapêuticos (KLEIN et al, 2009).

Estudos em óleos essenciais e extratos etanólicos de trinta e cinco plantas foram analisados quanto à sua atividade frente a *C. albicans*, onde não foi observada a efetividade de nenhum extrato, nas concentrações testadas. Já os óleos de manjerição e orégano apresentaram concentrações inibitórias mínimas (CIMs) maior que 2,0 mg/mL e o de tomilho, CIM igual a 2,0 mg/mL (DUARTE et al, 2005). Foi constatado em estudos de microdiluição em caldo, que o óleo essencial de orégano na concentração de 0,25 mg/mL, possui efeito fungicida e capacidade de inibir a formação de tubo germinativo de *C. albicans* e nas concentrações de 0,125 mg/mL e 0,0625 mg/mL, inibições de 75% e maiores que 50%, respectivamente (MANOHAR et al, 2001).

Em estudos de susceptibilidade a diferentes espécies de *Candida*, constatou-se que o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (árvore do chá) apresentou atividade com concentrações efetivas iguais, em cepas resistentes e sensíveis de *C. albicans* e *C. glabrata*, ao fluconazol. Este mesmo óleo, também foi ativo em espécies de *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. tropicalis* (VAZQUEZ et al, 2000). Acredita-se que sua atividade biológica está relacionada a alterações provocadas na permeabilidade e fluidez da membrana citoplasmática fúngica (COX et al, 2000; HAMMER et al, 2004).

A atividade fungicida do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. foi comprovada quando testado sobre quatro espécies de *Candida* (NAKAMURA et al, 2004). A *Curcuma zedoaria* apresentou atividade antifúngica *in vitro* sobre leveduras de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, isoladas da cavidade bucal de indivíduos HIV positivos (BERTINI et al, 2005).

Em testes com cepas de *C. albicans*, observou-se que *Piptadenea stipulacea* e *Byrsonima sericea* foram efetivas em 83% das cepas, inclusive em

uma cepa resistente a todos os outros extratos (SOARES et al, 2006). A atividade inibitória e fungicida sobre amostras de *Candida*, também foi comprovada para o extrato alcoólico de *Mentha piperita* (MATOS et al, 2009).

O extrato etanólico das folhas de *Schinus terebinthifolius* apresentou potencial atividade antimicótica contra *C. glabrata* e em análise fitoquímica preliminar, este extrato indicou a presença de compostos biologicamente ativos, tais como, saponinas, flavonóides, triterpenos, esteróides e taninos (JOHANN et al, 2007). A ação antimicrobiana dos vegetais e sua associação com a presença de taninos, flavonóides e polifenóis, já foi anteriormente relatada (REIS, 2006).

Flavonóides, triterpenos, esteróides e taninos têm sido relatados como constituintes de *Chrysobalanus icaco* e no extrato hexânico de folhas de *C. icaco* foi revelada atividade antifúngica frente à *Candida albicans* (CASTILHO et al, 2000; CHAUDHURI et al, 2002; FERNANDES et al, 2003).

Existem várias substâncias testadas e que apresentam atividade antifúngica frente a espécies de *Candida*, entre elas, destacam-se: carvacrol, eugenol, timol, trans-cinamaldeído. De *Sorghum bicolor* L., foi isolado o peptídeo 30kDa, que apresentou atividade contra *C. albicans*. Alicina e ajoeno, isoladas de *Allium sativum* L, eucaliptol (1,8 cianol) de *Eucalyptus globulus* Labill, ezeamatina de *Zeamays* L, são substâncias ativas contra diferentes gêneros de fungos, dentre estes, espécies de *Candida* (MINCOFF et al, 2005; TAMPIERI et al, 2005).

A ação terapêutica do carvacrol e do eugenol frente à *C. albicans*, foi avaliada *in vitro* em ratos imunodeprimidos, onde se observou CIMs de 6,5 mM e 12 mM, respectivamente, mostrando maior efetividade do carvacrol em relação ao eugenol (CHAMI et al, 2004). A atividade do composto fenólico carvacrol frente a espécies de *Candida*, também foi reportada em estudos que identificaram, após 48 horas de incubação, ação fungistática dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano), *Ocimum basilicum* (manjeriço), *Thymis vulgaris* (tomilho) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim), com CIMs de 500 ppm para os dois primeiros, 1000 ppm e 5000 ppm para os dois últimos, respectivamente (TAMPIERI et al, 2005; POZZATTI, 2007).

Estas evidências demonstram que as espécies vegetais e suas substâncias constituem-se em alternativas promissoras para emprego na terapêutica moderna. Portanto, torna-se imprescindível, o emprego de conhecimentos científicos que validem ou não, os conhecimentos tradicionais, com o objetivo não só de resgate

do patrimônio cultural e garantia de qualidade no uso de plantas medicinais, mas também como opção mais viável para o desenvolvimento sustentável e proteção das espécies vegetais em extinção, com maior possibilidade de acesso às novas terapêuticas medicamentosas (CAMPAGNOLI et al, 2004).

## **2.4 *Chrysobalanus icaco* Lin**

### **2.4.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS**

O *Chrysobalanus icaco* L (*C. icaco*) é originário do sul da Flórida, Caribe, América Central, do noroeste tropical da América do Sul e África Ocidental, tendo sido naturalizado e cultivado no Vietnã, Melanésia e Polinésia (FRANCIS, 2003; KRUEL e PEIXOTO, 2004; BROWN, 2011).

Especificamente no Brasil, é muito encontrado nos estados do Pará, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte; onde recebe várias denominações como ajiru, ajuru, ajuru branco, cajuru, bajurú, goajuru, guajiru, oajuru e abajeru (KRUEL e PEIXOTO, 2004). Nos países de língua inglesa, comumente é chamado de coco-plum, icaque-ponne, pork-fat-apple e zicate; nos de língua francesa, é chamado prunier de cacao (FRANCIS, 2003; KRUEL e PEIXOTO, 2004).

*C. icaco* é uma espécie arbustiva, que varia de 1,5 a 3 metros de altura (Figura 1, p. 32), encontrado nas zonas costeiras e litorais e que habita preferencialmente dunas, em áreas de restinga (VARGAS, 1998; KRUEL e PEIXOTO, 2004; FREITAS e LOCATELLI, 2009). Possui alta adaptabilidade a condições ambientais e resistência à salinidade e a níveis baixos de umidade, fogo e geadas moderadas (KRUEL e PEIXOTO, 2004).



Figura 1 - Aspectos gerais de distribuição em arbusto de *Chrysobalanus icaco* L.

A distribuição dos indivíduos de *C. icaco* favorece a polinização cruzada devido à proximidade uns dos outros. As flores de *C. icaco* possuem características morfológicas dependentes de insetos para sua polinização e formação de frutos e sementes, logo esta característica é determinante para sua distribuição (FREITAS e LOCATELLI, 2009).

Suas folhas são muito conhecidas popularmente pela propriedade hipoglicemiante (CASTILHO et al, 2000; FRANCIS, 2003; AGUIAR, 2010). Em 100 g de folhas desidratadas de *C. icaco* foram determinadas teor de umidade ( $10,46 \pm 0,27$  g), teor de proteínas igual a ( $10,53 \pm 0,14$  g) e teor para cinzas totais de ( $4,61 \pm 0,13$  g). Neste mesmo estudo, observou-se que as folhas de *C. icaco* se apresentavam ricas em cálcio, magnésio, ferro, manganês, cromo e selênio; além de apresentar alta concentração de fibra alimentar total, com maior proporção de fibras solúveis, baixa concentração de lipídios e com perfil de aminoácidos não relevante (AGUIAR, 2010).

Nas regiões litorâneas, o fruto de *C. icaco* é bastante consumido, mas no restante do Brasil ainda precisa ser explorado quanto ao seu valor econômico. Outro aspecto que merece ser ressaltado quanto ao *C. icaco* é que devido ao desmatamento, começa a ocorrer o seu desaparecimento; seja pela exploração inadequada da madeira ou devido a construções irregulares em áreas de restinga (AGUIAR, 2010). Logo, existe uma necessidade iminente do conhecimento de suas características e propriedades, prevenindo a sua extinção.

## 2.4.2 DESCRIÇÃO BOTÂNICA

Segundo Dalhgren (1982), *Chrysobalanus icaco* apresenta a seguinte classificação botânica:

Tribo: Chrysobalaneae;

Família: Chrysobalanaceae;

Ordem: Rosales;

Superordem: Rosidae;

Subclasse Dicotiledônea;

A família Chrysobalanaceae tem ocorrência em regiões tropicais e subtropicais, possui 17 gêneros e cerca de 450 espécies de hábito arbustivo e arbóreo (BRUMMITT, 1992). No Pará, existem registros de que esta família é constituída de 294 espécies, distribuídas em sete gêneros, alguns economicamente importantes, para indústria madeireira, como *Licania* e *Parinari*.

Esta espécie é uma planta arbórea silvestre de porte médio, com altura máxima de 3 metros, e ciclo de vida perenifólia. Seu tronco possui diâmetro de 15 cm a 30 cm e suas folhas, duras e ovais, de cor verde escuro brilhante na parte superior (Figura 2, p.34), possuem comprimento até 4 cm e largura de 3 a 6 cm (MATOS, 1999).



Figura 2 - Aspecto das folhas de *Chrysobalanus icaco* L.

O fruto de *C. icaco* é arredondado, com largura entre 2 e 5 cm, cor diversificada entre o branco-creme, rosa e a púrpura, com pequenas variações para o preto (Figura 3, p. 35). Apresenta polpa branca, um tanto esponjosa, adocicada ou insípida; quando em maturação, é bastante adstringente. A composição centesimal da polpa de abajeru revelou que este fruto apresenta baixa concentração de proteínas, lipídios e calorias; sendo uma importante fonte de minerais, com atividade antioxidante, como o selênio, cromo e cobre, além de outros de grande relevância, como o ferro e o cálcio, contudo a biodisponibilidade dos mesmos ainda não é conhecida (AGUIAR, 2010).

Sua semente é tipo noz (Figura 3, p. 35) constituída por uma casca dura e uma amêndoa tenra (VARGAS et al, 2000). A germinação de suas sementes ocorre entre 20 a 30 dias e sua forma de vida é classificada como heliófita ou higrófitas.



Figura 3 - Imagens dos frutos e semente de *Chrysobalanus icaco* L.  
Fonte: Aguiar, 2010.

As flores de *C. icaco* nascem em pequenos ramos auxiliares sendo pequenas e de cor verde e branca (Figura 4, p. 35) São geralmente vistosas, reunidas em inflorescência, bracteadas, com tubo floral desenvolvido (hipanto), cinco sépalas, cinco pétalas, livres, cinco a numerosos estames, às vezes dispostos unilateralmente, com filetes muitas vezes evidentes, excertos e coloridos, ovário súpero, com estilete inserido na base, ou seja, ginobásico (PRANCE, 1979).



Figura 4 - Imagens das flores de *Chrysobalanus icaco* L.

### 2.4.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A família Chrysobalanaceae, é composta por 17 gêneros e cerca de 450 espécies que apresentam flavonóides, diterpenóides, triterpenóides, esteróides e taninos em sua composição química (BRACA et al, 2001; BRACA et al, 2002; CHAUDHURI et al, 2002; FERNANDES et al, 2003; CASTILHO et al, 2005).

Os gêneros mais estudados do ponto de vista químico são: *Chrysobalanus*, *Couepia*, *Licania* e *Parinarium*. Da *Couepia paraensis* já foram isolados sitosterol, ácido oleanólico, ácido 3-acetiloleanólico, naringenina, quercetina, rutina, ácido espinósico, 5-hidróxi-2,8-dimetil-6,7-dimetóxicromona e 5-hidróxi-8-dimetil-6,7-desmetóxicromona-4-ona (SANDUJA et al, 1983).

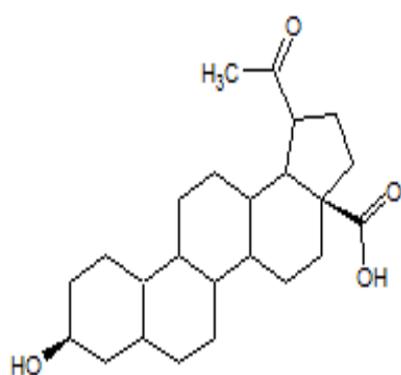
Da partição do extrato metanólico da *Licania tomentosa* foram isolados: ácido betulínico, licanolídeo, ácido palmitoléico, mistura de ácido palmitoléico e betulínico, ácido oleanólico, mistura de estigmasterol e sitosterol, lupeol, quercitrina, entre outros (FERNANDES et al, 2003).

O fracionamento cromatográfico realizado por espectroscopia dos extratos e das frações da partição do extrato metanólico de *Chrysobalanus icaco* possibilitou o isolamento de uma série homóloga de hidrocarbonetos de C27 a C33; de mistura de estigmasterol e sitosterol; de mistura estigmasterol, sitosterol e campesterol; de ácido betulínico (5a); de ácido pomólico (5b); e de 7-metilkaempferol (CASTILHO et al, 2000). Investigações fitoquímicas de extratos etanólicos obtidos das folhas de *C. icaco*, têm relatado a presença de Miricetina (5c) e indicam a mesma como

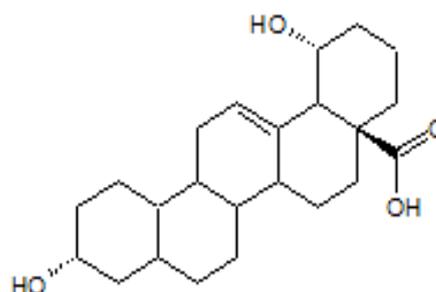
provável marcador taxonômico da espécie (MENDEZ et al, 1995; FERNANDES et al, 2003; BARBOSA et al, 2006).

O extrato aquoso e a tintura de *C. icaco* apresentaram rutina (5d) em sua constituição química, quando analisados por High Performance Liquid Chromatograph com Detector de arranjo de Diodos (HPLC/DAD) (BARBOSA e PERES, 2002). O extrato hidroalcoólico de *C. icaco*, ao ser analisado por HPLC/DAD e Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE), associado à espectrometria de massa (MS), apresentou miricetina-3-glicuronídeo-O (miricitrina, como constituinte majoritário), quercitrina, rutina e outros derivados menores de miricetina (BARBOSA e PERES, 2002; BARBOSA et al, 2006).

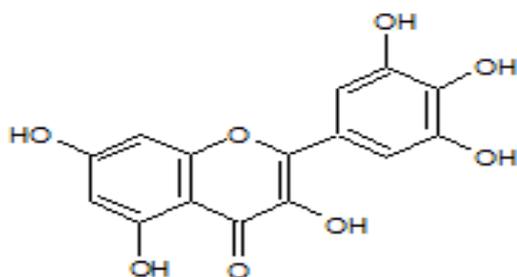
As principais estruturas químicas já identificadas em *Chrysobalanus icaco* encontram-se dispostas na Figura 5 (5a e 5b, p. 38 e 5c e 5d, p.37).



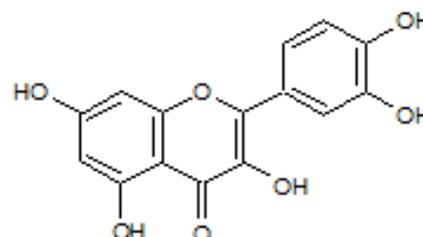
5a - Ácido betulínico



5b - Ácido pomólico



5c - Miricetina



5d - Rutina

Figura 5 - Estruturas químicas encontradas em *Chrysobalanus icaco* L: 5a - Ácido betulínico; 5b - Ácido pomólico, 5c - Miricetina; 5d - Rutina.

#### 2.4.4 CARACTERÍSTICAS ETNOFARMACOLÓGICAS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

A família *Chrysobalanaceae* compreende espécies com grande valor terapêutico, entre estas, destacam-se os gêneros *Chrysobalanus*, *Couepia*, *Licania* e *Parinari* (SANDUJA et al, 1982; CASTILHO et al, 2000).

Espécies do gênero *Parinari*, são empregadas no tratamento da malária, na medicina popular africana. No Brasil, as espécies *Chrysobalanus icaco* e *Licania rígida* destacam-se por seus efeitos hipoglicemiantes e diurético, comprovados farmacologicamente (LACET et al, 1983; PRESTA, 1986; PRESTA e PEREIRA, 1987 ; GESSLER et al, 1995).

Concernente à atividade biológica, as folhas do *C. icaco* possuem características analgésicas e antiinflamatórias, com principais relatos relacionados ao poder hipoglicemiante (CASTILHO et al, 2000; FRANCIS, 2003; AGUIAR, 2010). Na Amazônia Oriental, as raízes e folhas desta espécie, são usadas popularmente contra a disenteria e leucorréia (PRESTA e PEREIRA, 1987; JARDIM et al, 2005).

O extrato metanólico das folhas de *C. icaco* apresentou atividade antimicrobiana e estudos toxicológicos do extrato aquoso de suas folhas evidenciaram a presença de ação antioxidante (FERNANDES et al, 2003; FERREIRA-MACHADO et al, 2004). A ação antioxidante já havia sido reportada em outro gênero e atribuída aos flavonóides existentes na *Licania licaniaeflora* (BRACA et al, 2002).

A atividade citotóxica de *C. icaco* foi comprovada através do isolamento do ácido pomólico, substância extraída das folhas desta espécie, capaz de eliminar 80% a 90% das células cancerígenas, inclusive linhagens tumorais resistentes a múltiplas drogas (MDR) (CASTILHO et al, 2000; GATTASS et al, 2003).

Extratos e frações de *C. icaco* e *L. tomentosa* apresentaram atividade bacteriana frente à *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. O extrato metanólico das folhas de *C. icaco* apresentou ainda, atividade antiangiogênica e inibição da síntese protéica de células HeLa; além de ter sido evidenciada, a atividade hipoglicemiante de extratos hexânico e metanólico e frações em acetato de etila e butanol de *C. icaco* (CASTILHO et al, 2000).

Zuque et al (2004) ao analisar por disco difusão em ágar, os extratos etanólico e hexano de *Couepia glandiflora* (*Chrysobalanaceae*) observaram que os mesmos nas concentrações de 10000; 1000; 100; 50 e 25 mg/mL não foram ativos sobre cepas (ATCC 10231) de *C. albicans*. Entretanto, a atividade antifúngica dos extratos hexânicos de folhas de *C. icaco* e *L. tomentosa*, outras espécies da família *Chrysobalanaceae*, apresentaram atividade frente à *Candida albicans* (CASTILHO et al, 2000).

Estudos sugerem que a presença de diterpenos em *C. icaco* e espécies do gênero *Parinari*, está associada à potencialidade no tratamento da SIDA e propriedades antifúngicas, respectivamente (GUSTAFSON et al, 1991; GARO et al, 1997).

Todas estas evidências reforçam o grande potencial terapêutico que espécies pertencentes à família *Chrysobalanaceae*, entre estas *Chrysobalanus icaco*, podem apresentar frente a cepas ATCC e linhagens clínicas de *Candida*, contribuindo para o desenvolvimento de novos antifúngicos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Determinar a atividade antifúngica do extrato hidroalcoólico das folhas de *Chrysobalanus icaco* L (EHCi) frente à cepa ATCC e isolados clínicos de *Candida* sp.

#### 3.2 Objetivos Específicos

Caracterizar farmacognosticamente as folhas de *C. icaco* através de testes físicos, químicos e físico-químicos;

Determinar a atividade antifúngica, obtendo valores de CIM para o extrato hidroalcoólico das folhas de *C. icaco* frente a cepas ATCC e isolados clínicos orais de espécies de *Candida*;

Determinar os valores de CFM do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. icaco* frente a cepas ATCC e a isolados clínicos orais de *Candida spp.*

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Seleção da espécie vegetal

Há vários métodos usados na seleção de plantas para estudos botânicos, fitoquímicos, microbiológicos, toxicológicos, dentre estes, o levantamento etnofarmacológico tem se destacado (CALIXTO, 2000). No presente trabalho, a escolha da espécie vegetal compreendeu um universo de plantas nativas da Amazônia e foi baseada em relatos de uso popular em leucorréias e micoses, assim como em evidências científicas de potencial biológico (PRESTA e PEREIRA, 1987; CASTILHO et al, 2000; FERNANDES et al, 2003; FERREIRA-MACHADO et al, 2004; JARDIM et al, 2005).

*Chrysobalanus icaco* L foi escolhido pelas indicações etnofarmacêuticas e atividades biológicas comprovadas na terapêutica antifúngica (CASTILHO et al, 2000; JARDIM et al, 2005). Entretanto, a ausência de dados concernentes ao *C. icaco* que possam servir de base ou parâmetro para padronização de matérias-primas vegetais e controle de qualidade, conforme legislação vigente incita novos estudos com esta espécie.

### 4.2 Microrganismos

Para a realização da pesquisa foram utilizadas cepa ATCC (American Type Culture Collection) de *Candida albicans* (ATCC 40175) e onze (11) cepas de isolados clínicos orais de *Candida spp* provenientes de pacientes atendidos na Faculdade de Odontologia da UFPA. As cepas foram identificadas pelo Instituto Evandro Chagas (IEC), sob a supervisão da Dr<sup>a</sup> Maurimélia Mesquita. Para a obtenção das amostras clínicas orais o projeto foi aprovado no Comitê de Ética do Instituto de Ciências da Saúde, sob o parecer nº 060/11.

### 4.3 Solventes, reagentes e soluções

Acetato de etila, Acetona, Acetonitrila, Ácido acético glacial, Ácido bórico, Ácido cítrico, Ácido clorídrico, Ácido clorídrico diluído, Ácido fosfórico, Ácido sulfúrico, Ácido Trifluoroacético 0,5%, Ágar Sabouraud Dextrose (Himedia), Água esterilizada, Caldo Mueller Hinton (Merck), Clorofórmio (Isofar), Diclorometano (Isofar), Dimetilsulfóxido (Himedia), Etanol a 96° Gay-Lussac (GL) (Migako), Éter etílico, Hexano, Hidróxido de amônio, Tolueno, Acetato de etila, Anidrido acético, Sulfato de sódio, Metanol, Hidróxido de amônio.

Todos os solventes utilizados possuíam grau de pureza p.a. e eram da marca Nuclear, quando não especificado. A água ultra-pura usada foi de procedência do Laboratório de Fitoquímica (LAFQ) da UFPA.

Os Reativos de Kedde, Bouchardat, Dragendorff, Mayer, Fehling A e B e as soluções: solução de cloreto férrico 1% e 10%, lugol, niidrina a 1%, ácido clorídrico a 1%, ácido sulfúrico etanólico 12%, vanilina a 1%, carbonato de sódio a 25%, formaldeído a 4%, o-dinitrobenzeno a 5%, hidroxilamina a 10%, solução metanólica de hidróxido de potássio a 10%, solução aquosa de hidróxido de potássio 5%, HCl 1N, hidroxilamina a 10%, solução aquosa de vanilina a 1%, HCl 6N, peróxido de hidrogênio concentrado (30%), lugol, foram preparados no LAFQ da UFPA (BARBOSA et al, 2001).

#### **4.4 Equipamentos**

Agitador magnético com aquecimento (Fisatom 752A®), Agitador eletromagnético (Marconi®), Autoclave vertical (Phoenix®), Balança analítica (Bioprecisa modelo FA 2104N), Balança analítica (Gehaka modelo AG 200), Balança analítica (Gehaka modelo BK 600), Bomba de vácuo (Marconi), Câmara de fluxo laminar (Veco®), Câmara de ultravioleta de 254 e 365nm (Warning), Capela de exaustão (Quimis), Chapa de aquecimento (Quimis), Coluna cromatográfica Lichrosfer 100 RP-8 (Agilent Technologies), Cromatógrafo a líquido (Merck-Hitachi), Densitômetro (Densimat), Dessecador de vidros, Destilador de água, Estufa bacteriológica (Fanem), Estufa de ar circulante (Fabbe®), Estufa MD 1.2 (Medicate), Evaporador rotativo Laborata 4000 (Heidolph), Filtro de água ultra-pura (Milipore Water Purification Systems), Geladeiras, Liofilizador (Christh Alpha®), Moinho de facas de aço inoxidável, Mufla (Forlabo®), Pipeta calibrada de 100-1000 µL, Pipeta calibrada de 20 e 40 µL, Potenciômetro (Micronal®), Tamisador vibratório (Produtest®), Ultra-som (Maxiclean).

#### **4.5 Procedimentos éticos**

Conforme determinação legal expressa na Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o projeto foi realizado de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas envolvendo Seres Humanos, sendo submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) de Seres Humanos, do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da UFPA, registro CAAE 0051.0.073.000-11 e parecer nº 060/11 (Anexo A).

Os objetivos e condições da pesquisa foram esclarecidos aos potenciais participantes a fim de obter o seu consentimento para a realização da mesma através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo B).

#### **4.6 Coleta e identificação do material botânico**

A referida espécie vegetal foi coletada no município de Salinópolis, Pará (0° 36' 1, 76" S; 47° 18' 11, 70" O), no dia 12 de outubro de 2010, pelo farmacêutico-bioquímico Amiraldo Peres.

De seu ramo mais representativo, contendo parte florida, frutos, sementes e parte mediana da planta, foi preparada uma exsicata para facilitar a identificação da espécie (Figura 6, p. 44).

A identificação da espécie foi realizada por profissional especialista da área botânica, em órgão de referência, em comparação com exemplares de exsicatas já disponíveis no acervo do herbário.

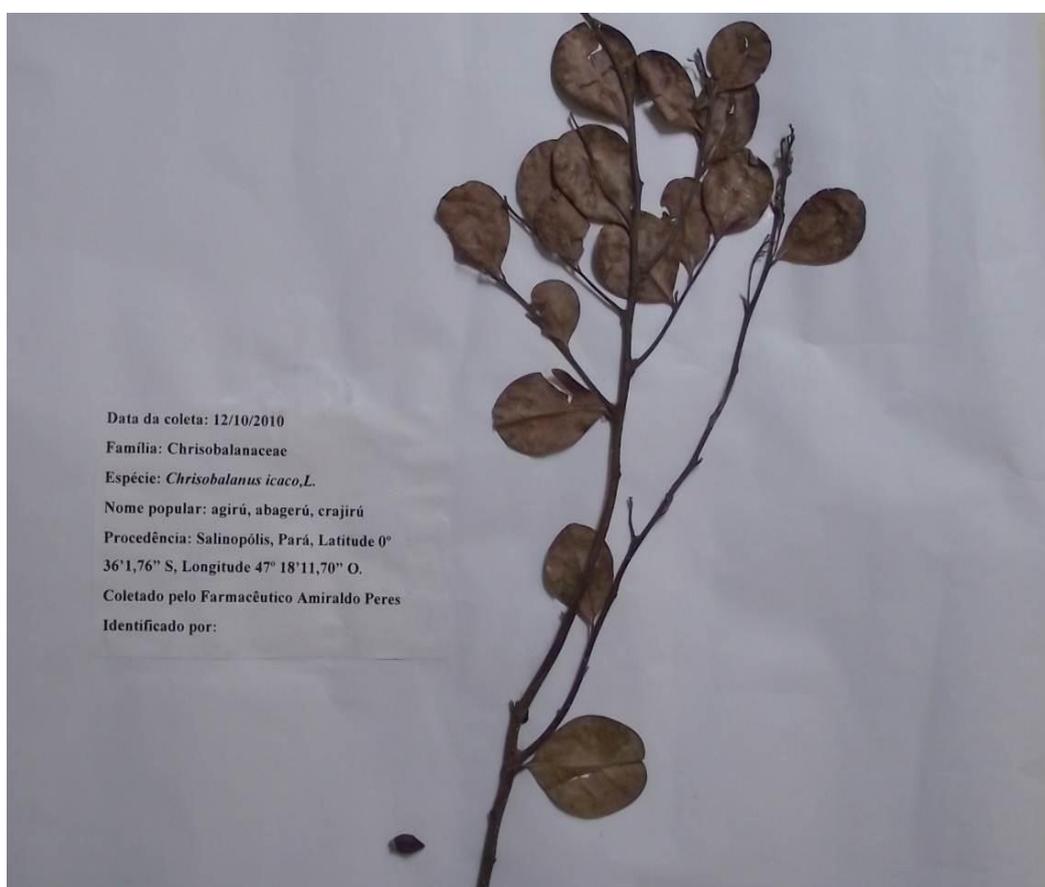


Figura 6 - Exsicata de *Chrysobalanus icaco* L enviada para identificação botânica.

#### 4.7 Preparo do material botânico

Após coleta, a espécie vegetal foi lavada em água corrente, com posterior desinfecção, usando gazes estéreis embebidas em solução hidroalcoólica a 70%. Após este procedimento, as folhas de *C. icaco* foram submetidas à secagem prévia por cinco dias, à temperatura ambiente, sobre bancadas previamente limpas e revestidas com papel absorvente. O processo de secagem foi finalizado em estufa com circulação de ar forçado a 40 °C, durante dois dias. Concluída a secagem, as folhas foram pesadas novamente e trituradas em moinho de facas para a obtenção da droga pulverizada.

#### **4.8 Preparo do extrato hidroalcoólico**

Duzentos gramas da droga vegetal pulverizada foram submetidos à maceração por sete dias em solução hidroalcoólica a 70% (600 mL). Posteriormente, o macerado obtido foi filtrado e a torta residual submetida à nova maceração (remaceração) em solução hidroalcoólica a 70% (600 mL) por seis dias. Após filtração, o remacerado foi reunido ao macerado formando o extrato hidroalcoólico de *C. icaco* e submetido à secagem em estufa à temperatura média de 45 °C para eliminação do solvente orgânico e excesso de água. Ao final, obteve-se o extrato bruto hidroalcoólico de *Chrysobalanus icaco* (EHCi) que foi armazenado em congelador sob baixa temperatura.

#### **4.9 Caracterização farmacognóstica**

##### **4.9.1 ANÁLISE GRANULOMÉTRICA DO PÓ**

Vinte e cinco gramas da droga vegetal pulverizada foram dispostos uniformemente no tamis superior, obedecendo à sequência: 1.700, 710, 250, 180,

150, 125 µm e coletor. O tamisador (Figura 7, p.46) foi acionado por 15 minutos (min), em escala cinco de vibração.

Após o término deste tempo, utilizando um pincel adequado, a amostra foi removida da superfície superior de cada malha para um papel impermeável e pesada, inclusive o pó retido no coletor.



Figura 7 - Tamisador usado para análise granulométrica de *Chrysobalanus icaco* L. com indicação da posição do número de cada tamis em µm (micrômetros).

O percentual retido em cada tamis foi obtido utilizando o seguinte cálculo (FARMACOPÉIA, 2010):

$$\% \text{ Retida pelo tamis} = \frac{P_1}{P_2 \cdot 100} \quad (1)$$

Onde:

$P_1$  = Peso da amostra retida em cada tamis (em gramas);

$P_2$  = Soma dos pesos retidos em cada tamis e no coletor (em gramas);

100 = Fator de porcentagem.

#### 4.9.2 DENSIDADE APARENTE

Em uma proveta de 25 mL, devidamente aferida, foi colocado o pó vegetal, tendo o cuidado de remover as partículas de ar que se formam entre o pó da planta e a proveta, este procedimento foi realizado até completar o volume de 15 mL. Em seguida, a proveta foi pesada, obtendo-se a massa de pó pela diferença de pesos. Em seguida, dividiu-se o peso do pó pelo volume (15 mL) obtendo-se a densidade aparente. Este procedimento foi realizado em triplicata, com média e desvio padrão calculado (LACHMAN et al, 2001).

#### 4.9.3 DENSIDADE DE MASSA E DENSIDADE RELATIVA

Utilizou-se picnômetro limpo e seco, com capacidade de 5 mL, previamente calibrado. A calibração consistiu na determinação da massa em triplicata do picnômetro vazio e da massa de seu conteúdo com água recentemente destilada e fervida a 26 °C. A amostra foi transferida para o picnômetro e a temperatura ajustada para 26 °C, o excesso da substância foi removido quando necessário, e o peso da amostra determinado através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio.

A densidade de massa ( $\rho$ ) de uma substância é a razão de sua massa por seu volume a 20 °C (FARMACOPÉIA, 2010). A densidade de massa da substância ( $\rho_t$ ) em uma determinada temperatura ( $t$ ) foi calculada a partir de sua densidade relativa ( $d_t^t$ ) pela fórmula:

$$\rho_t = d_{(água)}^t \times d_t^t + 0,0012 \quad (2)$$

Como a temperatura utilizada foi 26 °C, a fórmula foi expressa por:

$$p_{26} = 0,99678 \times d_{26} + 0,0012 \quad (3)$$

A densidade relativa foi determinada através da razão entre a massa da amostra líquida e a massa de igual volume de água, ambas a 26 °C, conforme equação 4:

$$d_{26} = \frac{\text{massa}_{(\text{substância})}}{\text{massa}_{(\text{água})}} \quad (4)$$

#### 4.9.4 DETERMINAÇÃO DA PERDA POR DESSECAÇÃO

##### 4.9.4.1 Método gravimétrico

Foi realizado em triplicata, onde dois gramas do pó das folhas do *C. icaco* foram transferidos para pesa-filtro chato previamente dessecado durante 30 minutos nas mesmas condições a serem empregadas na determinação. Após resfriamento em dessecador, os pesa-filtros, com a amostra foram tampados e pesados, posteriormente os mesmos foram balançados brandamente para distribuir as amostras de maneira mais uniforme possível. As amostras foram secadas em estufa a 105 °C por 2 horas, com retirada das tampas dos pesa-filtros, deixando-as também dentro da estufa (Figura 8, p.48).



Figura 8 - Seqüência de passos da perda por dessecação pelo método de gravimetria. A: após dessecação dos pesa-filtros em estufa, obtenção do peso do pesa-filtro sem a amostra; B: pesagem do pesa-filtro com 2g do pó das folhas de *C. icaco*; C: colocação dos pesa-filtros abertos com a amostra em estufa para dessecação; D: após retirada da estufa, armazenamento em dessecador para posterior pesagem.

Após resfriamento em dessecador, os pesa-filtros tampados foram pesados. Esta operação foi repetida até peso constante, ou seja, a diferença de peso do material vegetal entre duas pesagens consecutivas não deveria ultrapassar 0,5 mg; a porcentagem de perda por dessecação foi dada segundo equação 5 (FARMACOPÉIA, 2010):

$$\frac{P_u - P_s \times 100}{P_a} \quad (5)$$

Onde:  $P_a$  = peso da amostra;

$P_u$  = peso do pesa-filtro retido contendo a amostra antes da dessecação;

$P_s$  = peso do pesa-filtro retido contendo a amostra antes da dessecação.

#### 4.9.4.2 Dessecação usando balança de infravermelho (Infratest)

Após a retirada da umidade do equipamento, cerca de um grama da substância foi pesado e distribuído uniformemente no coletor de alumínio contido dentro do aparelho. Como não havia monografia da espécie em estudo, utilizou-se o tempo de um minuto, à temperatura de 105 °C, sugerido pela Farmacopéia Brasileira (2010). Decorrido o tempo, o valor da umidade em percentual que apareceu no *display* do aparelho, foi anotado. Este procedimento foi repetido em triplicata, calculando as médias e desvios padrões das três determinações.

#### 4.9.5 DETERMINAÇÃO DO pH

O pH foi determinado com auxílio de potenciômetro com ajuste automático de temperatura, devidamente padronizado com soluções tampões pH 4 e pH 7, segundo Normas Técnicas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). O pó das folhas de *C. icaco* foi primeiramente disperso e homogeneizado em água ultra-pura, resultando em uma solução a 1% (FARMACOPÉIA, 2010), ou seja, na proporção de

1:1 (m/v). A seguir, o eletrodo do potenciômetro foi introduzido e após a estabilização dos valores no painel, os resultados foram expressos em valores reais de pH (Figura 9, p.50).



Figura 9 - Medição do pH de *Chrysobalanus icaco* L através de potenciômetro de bancada.

#### 4.9.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS TOTAIS

Este procedimento baseou-se na Farmacopéia Brasileira (2010). Foi calcinado previamente o cadinho de porcelana em mufla a 600 °C, o mesmo foi resfriado em dessecador por trinta minutos e seu peso determinado em balança analítica. Foram pesados exatamente 3 g do material vegetal triturado, os quais foram submetidos à calcinação em mufla, à temperatura de 600 °C, por três horas. Foi deixado em dessecador para arrefecimento durante 30 minutos e pesagem posterior. A porcentagem de cinzas em relação à droga seca ao ar foi expressa pela média de três determinações e a sequência de passos para a determinação do teor de cinzas totais encontra-se ilustrado abaixo (Figura 10, p.51).

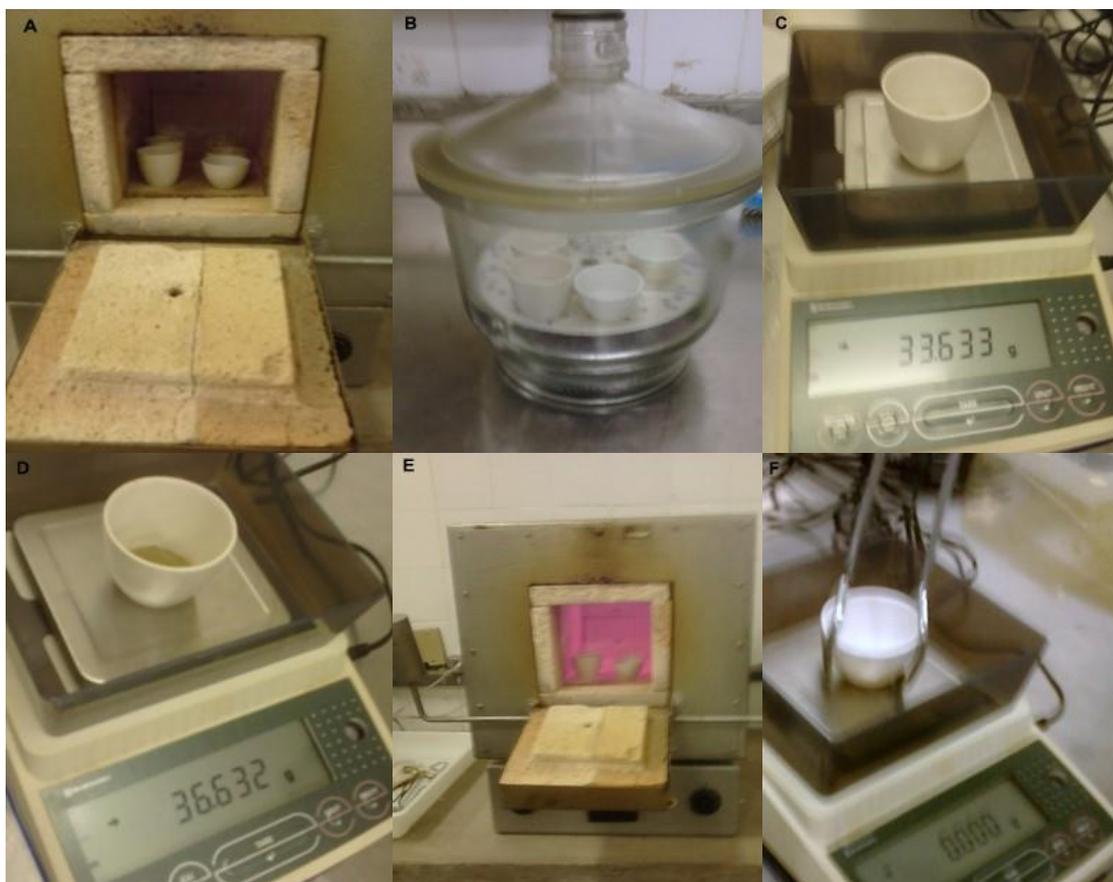


Figura 10 - Seqüência de passos na determinação do teor de cinzas totais. A: dessecação dos cadinhos; B: pesagem do cadinho sem a amostra; C: pesagem do cadinho com 3 g da amostra; D: colocação em mufla nas condições especificadas; E: colocação em dessecador, F: pesagem das amostras após colocação em mufla e dessecador.

#### 4.9.7 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS INSOLÚVEIS EM ÁCIDO

O resíduo obtido na determinação de cinzas totais foi fervido durante 5 minutos com 25 mL de ácido clorídrico a 7% (p/v) em cadinho coberto com vidro de relógio. A seguir lavou-se o vidro de relógio com 5 mL de água quente, juntando a água de lavagem ao cadinho. Recolheu-se o resíduo insolúvel em ácido, sobre papel de filtro, isento de cinza, lavando-o com água quente até que o filtrado se mostrasse neutro. O papel de filtro contendo o resíduo foi transferido para o cadinho original, secado sobre chapa quente e incinerado a cerca de 500 °C até peso constante

(FARMACOPÉIA, 2010). A porcentagem de cinzas insolúveis em ácido em relação à droga seca ao ar foi calculada com base na média de três determinações.

#### 4.9.8 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE EXTRATIVOS

Segundo Mello e Petrovick (2000), cerca de 1 g do pó das folhas, exatamente pesado, foi submetido à decocção com 100 mL de água, durante 10 min. Após o resfriamento, o volume foi completado a 100 mL. A solução obtida foi filtrada em papel de filtro e os primeiros 20 mL foram desprezados. Do restante do filtrado, pesou-se uma alíquota equivalente a 20 g, em pesa-filtro previamente tarado e evaporou-se até secura em banho de água, em agitação constante. O resíduo foi colocado em estufa, à temperatura de 105 °C por 3 h. Em seguida, resfriado em dessecador e pesado. O teor de extrativos foi calculado em massa percentual, pela média de três determinações segundo a equação:

$$TE = \frac{G \times FD \times 100}{M} \quad (6)$$

Onde:

TE = teor de extrativos (%; m/m);

G = massa de resíduo seco (g);

M = massa da amostra (g);

FD = fator de diluição (5).

#### 4.9.9 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE ESPUMA

Foi pesado 1 g do material vegetal reduzido a pó fino (malha de 180 µm), e transferido para erlenmeyer contendo 50 mL de água fervente. Mantido em temperatura moderada durante 30 minutos. A seguir, resfriado, filtrado para balão volumétrico de 100 mL. Em seguida o volume foi completado, através do filtro, até 100 mL. O decocto obtido foi distribuído em 10 tubos de ensaio com tampa (16 mm de diâmetro por 16 cm de altura), em série sucessiva de 1, 2, 3, até 10 mL, e o

volume do líquido foi ajustado em cada tubo a 10 mL com água. Os tubos foram tampados e agitados com movimentos verticais por 15 segundos, com duas agitações por segundo. Foram deixados em repouso por 15 minutos e a altura da espuma medida (FARMACOPÉIA, 2010).

O índice de espuma foi calculado em triplicata, segundo a equação:  $1000/A$ , sendo  $A$  o volume em mililitros, do decocto usado para preparação da diluição, em virtude dos tubos de número nove terem apresentado 1 cm de altura da espuma.

#### 4.9.10 DETERMINAÇÃO DO RESÍDUO SECO

Em placas de petri medindo aproximadamente 50 mm em diâmetro e 30 mm de altura, foram dispostos 0,5 g de extrato seco finamente pulverizado, em cada uma das três amostras utilizadas (Figura 11, p.53). Os mesmos foram colocados em estufa a 105 °C por 3 horas, em seguida armazenados em dessecador por trinta minutos (FARMACOPÉIA, 2010). Após pesagem, o resíduo seco foi calculado em porcentagem sobre a massa e obtido a média e desvio padrão das três determinações.

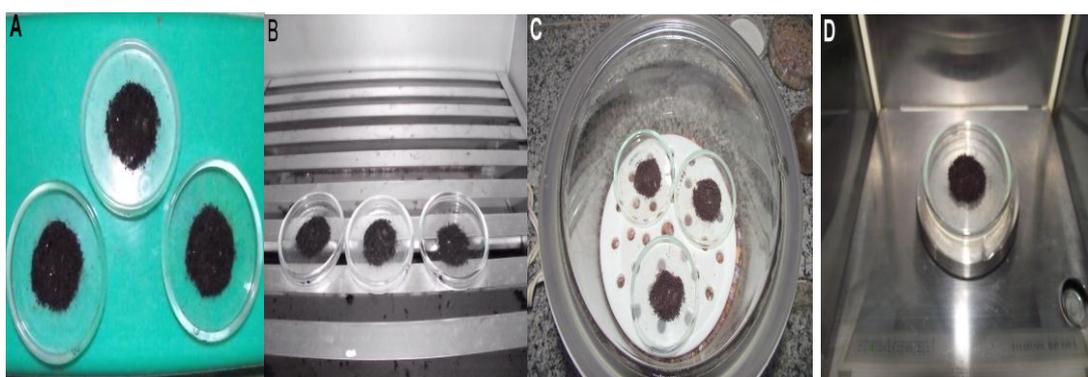


Figura 11 - Seqüência para determinação do resíduo seco: A- colocação em placas de petri; B- aquecimento em estufa por 3 horas; C- dessecação; D- pesagem.

#### 4.9.11 ABORDAGEM FITOQUÍMICA

Essa análise tem como objetivo a caracterização de diferentes classes de princípios ativos através de reações químicas. Foi realizada segundo as orientações contidas no Manual do LAFQ (BARBOSA et al, 2001). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, sempre com a presença de um tubo (branco) contendo apenas o meio e os reativos usados em cada teste, para fins de comparação da interferência da cor do extrato.

#### 4.9.11.1 Saponina espumídica

Uma alíquota de 25 mg dos extratos secos foi dissolvida em 5 mL de água destilada, e em seguida diluída para 15 mL, então agitou-se verticalmente a solução em tubo fechado, vigorosamente, por 2 min. Quando a camada de espuma permaneceu estável por mais de meia hora o resultado foi considerado positivo para saponina.

#### 4.9.11.2 Ácidos orgânicos

Dissolveu-se alguns miligramas do extrato seco em 5 mL de água destilada. Filtrou-se quando necessário. Transferiu-se 2 mL para um tubo de ensaio e adicionou-se gotas do Reativo de Pascová. Quando houve descoloração do reativo, a reação foi considerada positiva.

#### 4.9.11.3 Açúcares redutores

Uma alíquota de 25 mg dos extratos secos foi dissolvida em 5 mL de água destilada; filtrou-se quando necessário. Adicionou-se 2 mL do reativo de Fehling A e 2 mL do reativo de Fehling B. A mistura foi aquecida em banho maria em ebulição

por 5 min. O aparecimento de um precipitado vermelho tijolo indicou a presença de açúcares redutores.

#### 4.9.11.4 Polissacarídeos

Uma alíquota de 25 mg dos extratos secos foi dissolvida em 5 mL de água destilada; filtrou-se quando necessário. Adicionou-se duas gotas de Lugol. O aparecimento de coloração azul foi o indicativo de resultado positivo.

#### 4.9.11.5 Proteínas e Aminoácidos

Dissolveu-se 15 mg do extrato alcoólico em 3 mL de água destilada, quando necessário, o mesmo foi filtrado. Adicionou-se 0,5 mL de solução aquosa de Nihidrina a 1%, aqueceu-se até a ebulição. O aparecimento de coloração violeta persistente indicou reação positiva.

#### 4.9.11.6 Fenóis e Taninos

Uma alíquota de 25 mg dos extratos secos foi dissolvida em 5 mL de água destilada; filtrou-se quando necessário e adicionou-se uma ou duas gotas de solução alcoólica de  $\text{FeCl}_3$  a 1%. Qualquer mudança de coloração ou formação de precipitado indicou reação positiva quando comparado ao teste em branco (água + sol. de  $\text{FeCl}_3$  a 1%). Coloração inicial entre o azul e o vermelho determinou a presença de fenóis, quando o teste em branco foi negativo. Precipitado escuro de tonalidade azul indicou a presença de taninos pirogálicos (hidrolisáveis) e verde, a presença de taninos catéquicos (condensados).

#### 4.9.11.7 Flavonóides

Uma alíquota de 25 mg dos extratos secos foi dissolvida em 10 mL de metanol; filtrou-se se necessário. Adicionou-se cinco gotas de HCl concentrado e raspas de magnésio. O surgimento da coloração rósea a vermelha na solução indicou reação positiva.

#### 4.9.11.8 Alcalóides

Uma alíquota de 25 mg dos extratos secos foi tratada com 5 mL de solução de HCl a 5%; filtrou-se quando necessário. Separou-se quatro porções de 1 mL em tubos de ensaio e adicionou-se gotas dos reativos abaixo:

a) Reativo de Bouchardat: Resultado positivo quando houve formação de precipitado laranja avermelhado.

b) Reativo de Dragendorff: Resultado positivo em caso de formação de precipitado vermelho tijolo.

c) Reativo de Mayer: Resultado positivo se houve formação de precipitado branco.

#### 4.9.11.9 Glicosídeos cardiotônicos

Uma alíquota de 25 mg dos extratos secos foi dissolvida em 5 mL de metanol; filtrou-se quando necessário. Separou-se duas porções de 2 mL cada e adicionou-se duas gotas do reativo de Kedde. Coloração azul ou violeta indicou reação positiva.

#### 4.9.11.10 Purinas

Numa cápsula de porcelana, juntou-se cerca de 5 mg do extrato seco, com três gotas de solução de HCl 6N e duas gotas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrado (30%). Evaporou-se em banho maria. Após formação de um resíduo corado de vermelho, juntou-se três gotas de solução de NH<sub>4</sub>OH 6N. O surgimento de coloração violeta indicou reação positiva.

#### 4.9.11.11 Catequinas

Dissolveu-se 15 mg do extrato seco em 3 mL de metanol. Filtrou-se quando necessário. Adicionou-se um mililitro de solução aquosa de Vanilina a 1% e 1 mL de HCl concentrado. O surgimento de uma coloração vermelha intensa determinou reação positiva.

#### 4.9.11.12 Sesquiterpenolactonas e outras lactonas

Dissolveu-se 15 mg do extrato seco em 3 mL de metanol; filtrou-se quando necessário. Adicionou-se 12 gotas da solução alcoólica de Cloridrato de Hidroxilamina a 10% e 2 gotas de solução metanólica de KOH a 10%. A mistura foi aquecida suavemente em banho maria por 2 min. Após esfriamento, a solução foi acidificada HCl 1N. Adicionou-se ainda uma gota de FeCl<sub>3</sub> a 1%. O aparecimento de coloração violeta indicou reação positiva.

#### 4.9.11.13 Esteróides e triterpenóides

Dissolveu-se 25 mg do extrato seco em 10 mL de Clorofórmio. Em seguida, filtrou-se em carvão ativado, o filtrado obtido foi transferido para tubo de ensaio seco. Adicionou-se 1 mL de Anidrido Acético, agitou-se suavemente e acrescentou-se cuidadosamente 3 gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, seguida de

agitação. Quando houve rápido desenvolvimento de cores do azul evanescente ao verde persistente, foi indicação de reação positiva.

#### 4.9.11.14 Carotenóides

Dissolveu-se 5 mg do extrato seco em 3 mL de Clorofórmio. Esta solução foi filtrada quando necessário, e a este filtrado foi adicionado algumas gotas de Ácido Trifluoroacético. O surgimento de cor azul foi indicativo de reação positiva.

#### 4.9.11.15 Depsídeos e Depsidonas

Dissolveu-se 15 mg do extrato seco em 5 mL de Éter Etílico. Esta solução foi filtrada quando necessário, e todo o Éter foi evaporado em banho maria, a seguir foram adicionados a este resíduo, 3 mL de Metanol. Posterior à solubilização, foram adicionadas três gotas de solução de  $\text{FeCl}_3$  a 1%. O aparecimento de cor verde, azul ou cinza, indicou reação positiva.

#### 4.9.11.16 Derivados da Cumarina

Dissolveu-se 15 mg do extrato seco em 5 mL de Éter Etílico, concentrou-se em banho maria até 0,5 mL. Em papel filtro, foram aplicadas gotas da solução etérea, de modo a formar duas manchas de aproximadamente 1 cm de diâmetro cada. A uma destas, juntou 1 gota de solução de NaOH a 1N. Cobriu-se a metade da mancha com papel escuro, e a outra metade foi exposta à luz ultravioleta. A seguir comparou-se; quando ocorreu fluorescência azul na parte exposta da mancha, isto foi indicativo de reação positiva.

#### 4.9.11.17 Antraquinonas

Dissolveu-se 15 mg do extrato seco em 5 mL de Tolueno. Filtrou-se quando necessário e adicionou-se 2 mL de solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$  a 10%, agitando-se suavemente. O surgimento de coloração rósea, vermelha ou violeta na fase aquosa, indicou reação positiva.

#### 4.10 Análise do EHCi por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As amostras foram solubilizadas em metanol grau HPLC obtendo-se uma concentração final de 01 mg/mL, filtrando-se em seguida sobre membrana de politetrafluoretileno (PTFE) com poros de 0,22  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Para esta etapa foi utilizado um cromatógrafo marca MERCK-ITACHI® (Alemanha), modelo LaChrom 7000 com detector de UV com arranjo de diodos (CLAE-DAD) qualificado, coluna Lichrosfer RP 18 com 4,5mm de diâmetro, com fluxo de 0,8 mL/min em sistema gradiente de Água/Ácido trifluoroacético 0,5% e Acetonitrila/Ácido Trifluoroacético 0,5% em gradiente, sendo que os cromatogramas foram registrados em 220, 230, 250, 300, 350 e 400 nm, volume de injeção fixo de 20  $\mu\text{L}$ , com tempo de análise de 32 min.

#### 4.11 Obtenção dos Isolados Clínicos Orais

Após autorização do Comitê de Ética (Anexo A), isolados clínicos foram coletados da cavidade bucal de indivíduos submetidos a tratamento clínico odontológico na Faculdade de Odontologia da UFPA. A coleta das amostras foi realizada através de *swab* estéril passado levemente no palato, mucosa jugal e

borda posterior da língua de cada paciente e armazenado em tubo de ensaio contendo 2 ml de solução fisiológica estéril a 10%.

A seguir, as amostras foram semeadas em placas estéreis contendo ASD com cloranfenicol a 0,02% e incubadas por 24 a 48 horas em estufa a 35°C. Posteriormente, as amostras positivas para *Candida* foram transferidas para tubos inclinados estéreis contendo ASD e encaminhadas ao Instituto Evandro Chagas (IEC), para identificação quanto às espécies.

Todos os pacientes selecionados assinaram o TCLE (Anexo B) e foram submetidos a questionário e exame clínico oral, realizado por Cirurgiã-Dentista, com registro em ficha de anamnese odontológica (Anexo C).

#### 4.11.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Pacientes de ambos os sexos, na faixa etária entre 18 e 59 anos, que não possuíam diagnóstico de Diabetes ou doenças imunossupressoras, não usuários de antibioticoterapia recente e/ou imunossupressora nos últimos dois meses, não usuários de drogas; não portadores de próteses bucais, sem candidíase diagnosticada clinicamente, e que assinem o TCLE.

#### 4.11.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Crianças, gestantes, indígenas, pacientes acima de 59 anos, ou que apresentem quaisquer dos critérios expostos no subitem 5.8.1.

#### **4.12 Atividade antifúngica do (EHCi) frente a isolados clínicos e cepas ATCC de *Candida spp.***

Os testes de sensibilidade *in vitro* para fungos são empregados sempre que se deseja o controle da terapêutica antimicótica e a busca por alternativas, entre estas, o uso de extratos vegetais com atividade biológica (OLIVEIRA et al, 2006).

#### 4.12.1 PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE (SE) DE EHCi

Para a constituição da solução estoque, 1000 mg do EHCi foram colocados em frascos estéreis de vidro e dissolvidos em 20 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%, dentro de câmara de fluxo laminar e posteriormente levados ao Vórtex por sessenta segundos. As soluções estoques do EHCi ficaram na concentração inicial de 50 mg/mL e foram armazenadas sob refrigeração a - 20 °C. Antes de serem utilizadas, eram retiradas do refrigerador, deixadas em bancada até temperatura ambiente (28 a 30 °C) para execução dos ensaios microbiológicos.

#### 4.12.2 PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura utilizados foi o caldo Mueller Hinton (MERCK, Alemanha) e ágar Sabouraud dextrose (HIMEDIA, Índia). Estes meios foram preparados a partir de uma base desidratada disponível comercialmente e conforme as instruções do fabricante.

#### 4.12.3 PREPARO DOS INÓCULOS FÚNGICOS



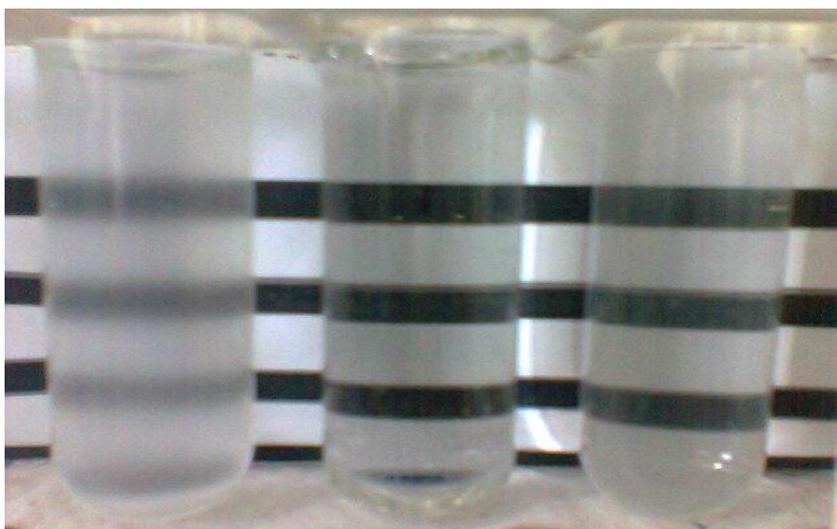
Para o preparo dos inóculos foram utilizadas 12 cepas, sendo uma cepa de *Candida albicans* (ATCC 40175) obtida a partir da coleção do Instituto Nacional de Controle de

Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ – Rio de Janeiro) e onze (11) cepas de isolados clínicos de *Candida* spp, oriundos da cavidade oral de pacientes atendidos na Faculdade de Odontologia da UFPA. As cepas foram mantidas em ágar Sabouraud dextrose, à temperatura ambiente, no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará/UFPA (Figura 12, p.62).

Figura 12 - Condições de armazenamento dos isolados de *Candida* sp.

Após o período de incubação, 3 a 4 colônias dessas leveduras foram transferidas para tubo estéril contendo 1 mL de solução salina estéril (9,0 g/L NaCl; salina a 0,9%). Quando necessário, realizou-se ajustes para o alcance da concentração desejada de aproximadamente  $1 \times 10^6$  UFC/mL, correspondente a escala 0,5 de McFarland (Figura 13, p.62).

Figura 13 - Ajuste do inóculo fúngico à escala 0,5 de McFarland: A - inóculo sem ajuste; B - tubo 0,5 da escala de McFarland e C - inóculo ajustado.



Em seguida, realizou-se uma diluição com meio Mueller Hinton, de 1:100, seguida de 1:20, obtendo um concentração final de aproximadamente  $5,0 \times 10^2$  a  $2,5 \times 10^3$  células por mL (Figura 14, p.63). Posteriormente, o inóculo foi mantido em estufa a 35 °C por 2 h, a fim de estimular o crescimento exponencial da levedura.



Figura 14 - Diluição dos inóculos fúngicos em caldo Mueller Hinton.

#### 4.12.4 TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO EM PLACAS PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A atividade antifúngica do EHCi foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo segundo a Norma M27-A2 do CLSI (NCCLS, 2002) com modificações, conforme Quadros et al (2011). A atividade antifúngica se baseou na determinação da CIM e CFM, usando placas de poliestireno de 96 poços. A CIM foi considerada a concentração capaz de inibir pelo menos 50% do crescimento do microrganismo. A CFM foi definida como a menor concentração do extrato capaz de inibir 99 a 100% do crescimento fúngico.

Após a preparação do inóculo, foram adicionados 100  $\mu$ L da suspensão de cada isolado de *Candida spp*, aos poços. Posteriormente, adicionou-se nos poços 100  $\mu$ L das soluções padronizadas de EHCi na concentração inicial de 6,25 mg/mL, até a concentração de 0,19 mg/mL (Figura 15, p.64).



Figura 15 - Esquema de diluições e concentrações finais de EHCi.

Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, e após esse tempo, 20  $\mu$ L de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium (MTT) foram acrescentados aos poços, para identificação da CIM. Para a obtenção da Concentração Fungicida Mínima (CFM), 10  $\mu$ L das amostras foram semeados em ágar Sabouraud dextrose e incubados por mais 24 horas a 37 °C para posterior leitura das Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Todos os ensaios foram realizados em duplicata. Para o controle positivo, foi utilizado o antifúngico comercial Nistatina (50.000 UI/mL) e como controle negativo, foi utilizada a solução de DMSO com concentração inicial de 2,5% (Figura 16, p.64).

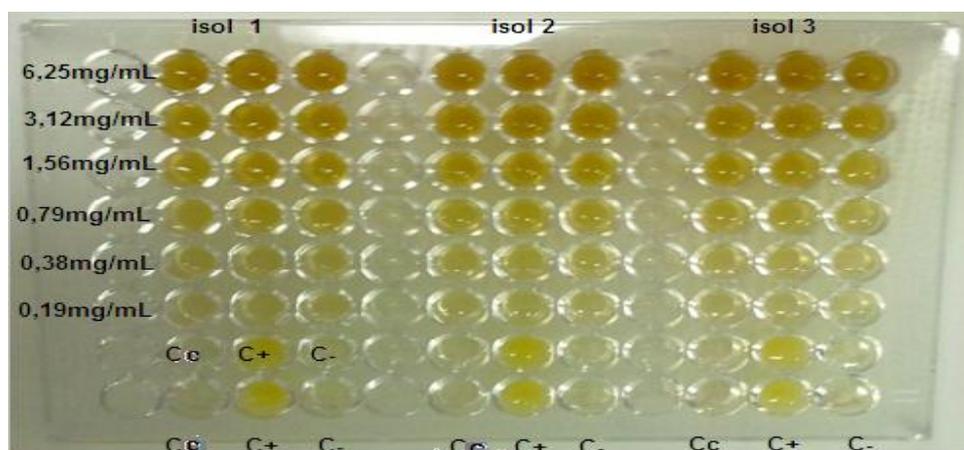


Figura 16-Disposição de EHCi em triplicata nas concentrações de 6,25 mg/mL(linha A);3,12 mg/mL (linha B), 1,56 mg/mL (linha C); 0,78 mg/mL; 0,39 mg/mL (linha D); 0,19 mg/mL (linha E); Cc: 200  $\mu$ L de inoculo: controle de crescimento; C+: Nistatina a 50.000 UI/mL e C-: DMSO a 2,5%.

#### 4.12.5 Detecção da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM<sub>50</sub> foi estipulada a partir da menor concentração do EHCi capaz de impedir o crescimento de pelo menos 50% do microrganismos avaliado (efeito fungistático). Esse efeito foi observado pela técnica da contagem das UFCs em placas de petri, e por microdiluição em caldo com coloração por MTT (Figura 17, p.65), como descrito na Norma M27-A2 do CLSI (NCCLS, 2002) e por Quadros et al (2011).

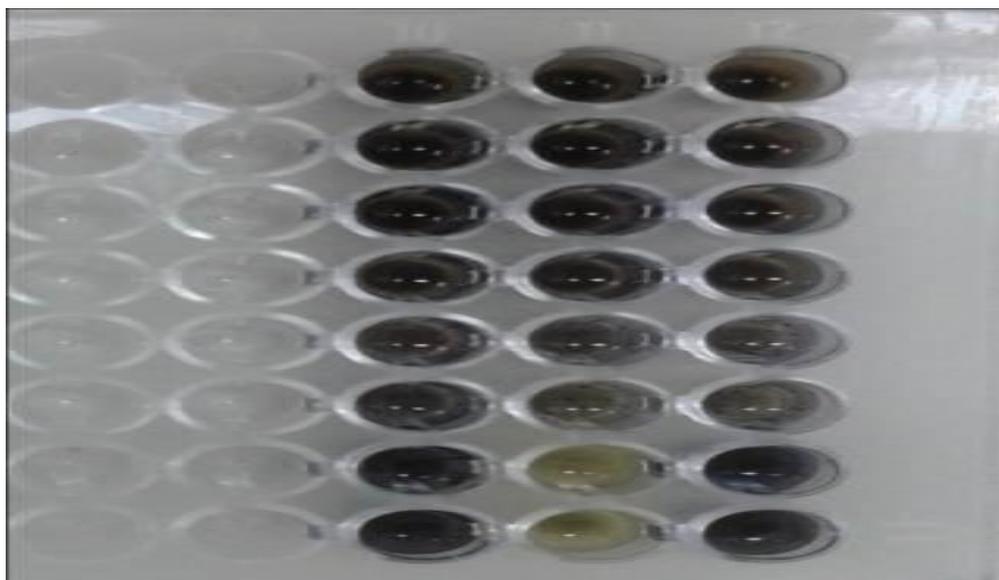


Figura 17 - Microdiluição da ATCC 40175 de *Candida albicans* após uso de MTT.

#### 4.12.6 Contagem da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A CFM é a menor concentração de um agente microbiano capaz de matar 99 a 100% dos microrganismos testados (efeito fungicida). A CFM foi obtida a partir da técnica de contagem das UFC, sendo considerada a menor concentração do extrato que resultou em nenhum crescimento ou no crescimento de no máximo três colônias placas (99,9% de morte), conforme descrito por Quadros et al (2011).

#### 4.13 Análise estatística

Análise descritiva comparativa utilizando os softwares Excel - MICROSOFT e BioStatic 5.0.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 5.1 Coleta e preparo da exsicata para identificação botânica

A identificação botânica correta da matéria-prima vegetal é imprescindível em qualquer pesquisa com plantas medicinais. Consiste na comparação da espécie vegetal em questão com uma espécie existente em uma coleção e/ou com descrições e ilustrações encontradas na literatura.

No presente estudo optou-se em coletar a espécime vegetal no seu habitat natural, evitando possíveis erros de identificação e maior controle das variáveis que podem interferir na qualidade final da droga vegetal.

A exsicata, contendo caule, folhas, flores e frutos foi preparada obedecendo ao estabelecido no Manual do LAFQ da UFPA (BARBOSA et al, 2001) e enviada, juntamente com informações adicionais (local da coleta, data e hora da coleta, nome do coletor), ao Herbário da EMBRAPA. O material botânico enviado foi comparado com exsicatas depositadas no herbário da EMBRAPA e identificado como *Chrysobalanus icaco* Lin, pela pesquisadora Silvane Tavares Rodrigues, com tomo de número NID: 40/2011(Anexo D).

## 5.2 Preparo do material vegetal

As folhas do *C. icaco*, após desinfecção, foram submetidas à secagem em temperatura ambiente por 5 dias e posteriormente em estufa sob temperatura adequada, por 2 dias. Este procedimento foi realizado com monitoramento diário e teve como finalidade a retirada de água, impedindo reações de hidrólise e de crescimento microbiano, promovendo a redução de volume e peso do material vegetal usado, assim como facilitou a moagem, etapa subsequente à secagem.

A moagem foi realizada em moinho de facas apropriado para o material vegetal em questão (SONAGLIO et al, 2003).

## 5.3 Processamento da amostra

Partindo de um total de dois quilogramas e trezentos gramas (2.300 g) de folhas frescas de *C. icaco*, após lavagem, secagem e trituração, foi obtido um quilograma e cento e sessenta gramas (1.160 g) de pó, representando um rendimento de 50,43% deste pó em relação à planta fresca.

#### **5.4 Preparo do extrato hidroalcoólico**

Partindo-se de um macerado em álcool 70 °GL constituído de duzentos gramas (200 g) do pó das folhas do *C. icaco*, concentrado em evaporador rotativo a baixa pressão, com posterior secagem em estufa, resultou em 32,49 g de extrato bruto. Um rendimento de 16,24% em relação à droga vegetal seca (pó) e 8,19% em relação à planta fresca.

#### **5.5 Caracterização farmacognóstica**

##### **5.5.1 DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DO PÓ**

A pulverização da matéria prima vegetal representa na maioria das vezes o insumo indispensável para obtenção de preparações intermediárias e o rendimento do processo extrativo quanto aos constituintes químicos de interesse na droga; está diretamente relacionada ao grau de pulverização da mesma (SILVA JÚNIOR, 2006).

A determinação granulométrica mostra-se ainda como um importante método para a determinação do tamanho de partículas, onde o mesmo é definido aproximadamente ao tamanho do orifício do tamis em que ficou retida a maior parte do material, servindo de parâmetro imprescindível para a caracterização e controle de qualidade do pó vegetal (FOUST, 2000; LACHMAN et al, 2001).

Segundo a Farmacopéia Brasileira (2010), o pó obtido das folhas do *C. icaco* foi classificado como pó moderadamente grosso, pois após análise em triplicata do

percentual médio retido em cada tamis, observou-se que o pó passou quase que em sua totalidade pelo tamis de abertura nominal de 710  $\mu\text{m}$  (mesh), e menos de 40% pelo tamis de 250  $\mu\text{m}$  (60 mesh), conforme ilustrado na Figura 18.

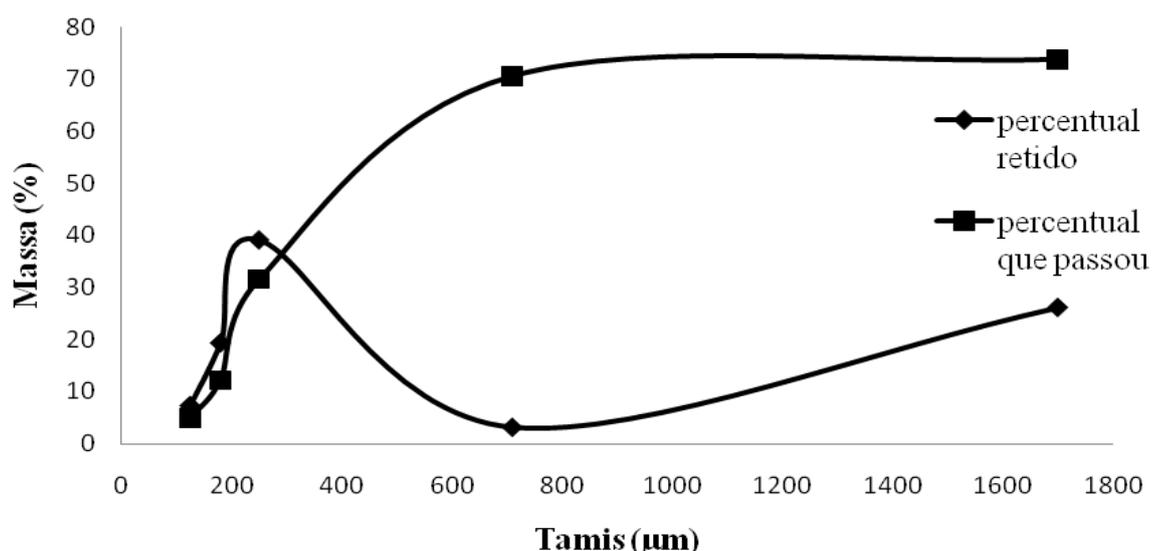


Figura 18 – Análise granulométrica do pó das folhas de *Chrysobalanus icaco*.

## 5.5.2 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE

### 5.5.2.1 Densidade Aparente

A densidade aparente do pó das folhas de *C. icaco*, com média e desvio padrão, foi de 0,4573 g/mL  $\pm$  0,1074 g/mL. A densidade aparente é importante no processo de manipulação correta de fitoterápicos e constitui-se numa exigência estabelecida pela RDC nº 48 (ANVISA, 2004).

### 5.5.2.2 Densidade de massa e densidade relativa pelo método de picnometria

A densidade é uma propriedade física importante e pode ser utilizada para distinguir um material puro de um impuro (ou de ligas desse metal), pois a densidade dos materiais que não são puros (misturas) é uma função da sua composição, podendo ser utilizada na identificação e no controle de qualidade de um determinado produto industrial, bem como ser relacionada com a concentração de soluções (HAWKES, 2004).

Os valores para densidade de massa e densidade relativa de *C. icaco*, obtidas através do método do picnômetro, estão descritas na Tabela 1 (p.70).

Tabela 1 - Média e desvio padrão da densidade de massa e da densidade relativa do decocto expressos em (g/mL) grama por mililitro, do pó das folhas do *Chrysobalanus icaco* L.

Parte da espécie	Média	Desvio padrão
Densidade de massa	1,01068 g/mL	± 0,00052 g/mL
Densidade relativa	1,01305 g/mL	± 0,00004 g/mL

### 5.5.3 DETERMINAÇÃO DE PERDA POR DESSECAÇÃO

Este teste estabelece parâmetro para a conservação do extrato e controle microbiológico do mesmo; o excesso de água pode ocasionar hidrólise dos constituintes da espécie vegetal e/ou favorecer o crescimento de enzimas, fungos e bactérias (OLIVEIRA, 1991; SHARAPIN, 2000; SIMÕES et al, 2007).

#### 5.5.3.1 Perda por dessecação através de gravimetria

A média da perda de água por dessecação no pó das folhas do *C. icaco* foi 12,3%, com desvio padrão de ± 0,029, como a referida espécie ainda não

apresenta monografia publicada, utilizou-se como parâmetro aceitável aquele que está de acordo com a especificação da Farmacopéia Brasileira (1988), onde este resultado pode variar de 8 a 14%. Com base nos resultados obtidos, constata-se que é possível manter a qualidade da droga vegetal, desde que armazenada adequadamente, evitando com isso contaminação e decomposição dos constituintes químicos.

Aguiar (2010) ao determinar a perda por dessecação de folhas de *C. icaco* obteve valores médios de 10,46%  $\pm$  0,27. Esta variabilidade pode ter ocorrido em virtude do tempo e local distintos da coleta da espécie, da forma de armazenamento da espécie, que foram diferentes nos estudos em questão.

### 5.5.3.2 Perda por dessecação através de Balança de Infravermelho (Infratest)

Este tipo de análise é essencial uma vez que pode oferecer informações importantes com referência ao armazenamento da droga vegetal. A água residual encontrada na droga vegetal seca está diretamente relacionada com o seu correto armazenamento, que pode acarretar na perda do material por contaminação microbiana ou degradação por ação enzimática dos constituintes químicos (SIMÕES et al, 2007).

A média e o desvio padrão das três determinações da perda por dessecação do pó das folhas do *C. icaco* obtidas através do Infratest, durante 1 minuto podem ser visualizadas na tabela 2 (p. 72).

Tabela 2 - Média e desvio padrão da perda por dessecação do pó das folhas de *C. icaco* obtida após um minuto, em porcentagem (%), usando balança de infravermelho (Infratest).

Parte da espécie	Média (%)	Desvio padrão
Folha de <i>C. icaco</i>	1,33	$\pm$ 0,321

O limite máximo de umidade para drogas vegetais é de 14% (SIMÕES et al, 2007) por isso constatou-se que o pó das folhas do *C. icaco* analisado apresentou resultado satisfatório, pois em um minuto apresentou média de perda de dessecação de 1,3% e após estabilização do processo de perda de água, apresentou média de 12,3%.

#### 5.5.4 DETERMINAÇÃO DO pH DO EXTRATO

Nas plantas são encontradas várias substâncias de caráter ácido, principalmente orgânicos, pertencentes a diversos grupos: aromáticos, terpenóides, heterocíclicos, que podem ser encontrados na forma de sais, ésteres, lactonas; nos lipídeos, na forma de essências e resinas (COUTO, 2005).

Uma parte destes ácidos encontra-se também no estado livre, solubilizados no citoplasma, portanto, podem ser identificados e caracterizar determinado extrato vegetal, como de caráter ácido e básico, auxiliando nos parâmetros físico-químicos da droga vegetal (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

A medida de pH influencia no desenvolvimento de microorganismos, na atividade enzimática, na maturação de vegetais, no emprego da temperatura em tratamentos térmicos, no uso de conservantes químicos, no controle de processos de lavagem, na escolha da embalagem na qual será acondicionado o produto, entre outros (CHAVES, 1993; CECCHI, 2003).

O valor obtido pela média de três determinações para o pH do extrato aquoso a 1% de *C. icaco* foi  $5,8 \pm 0,001$ , um pouco superior ao encontrado por Aguiar (2010) que obteve valor de  $5,18 \pm 0,001$  para a decocção das folhas de *C. icaco*. Esta variação pode ser em virtude dos diferentes locais de coleta, clima distinto e até ao próprio grau de maturação da espécie (COUTO, 2005).

Contudo, apesar da diferença de pH obtidos nos dois estudos, observa-se segundo Franco e Landgraf (1996) que ambos são considerados de baixa acidez, pois apresentam pH superior a 4,5.

#### 5.5.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS TOTAIS

A determinação de cinzas totais visa determinar a quantidade de substâncias residuais não voláteis, isentas de carbono, entre estas, as derivadas de tecido vegetal (cinzas fisiológicas) e as de material estranho (cinzas não fisiológicas), entre estes, areia e terra (LEITE et al, 2009). O valor obtido para o teor de cinzas totais, a partir da média das três determinações do pó das folhas de *C. icaco* foi de  $4,31\% \pm 0,0001$ . O percentual obtido corresponde aos constituintes minerais e organometálicos da planta ou de substâncias de origem terrosa (SIMÕES et al, 2007; VIGO et al, 2004).

Quando o teor de cinzas totais é muito alto, há indícios de contaminação por areia e terra, proveniente de tratamento inadequado na colheita, higienização e processamento do material vegetal, logo o mesmo, constitui-se, dentro de certos limites, em um parâmetro de identificação e pureza, contudo há necessidade de estabelecer a variação aceitável para o mesmo (NAVARRO et al, 2008; LEITE et al 2009).

Não foi encontrada monografia da planta para a preconização de valor aceitável e tomando como base o limite geral determinado pela Farmacopéia Brasileira (2000) que é de 14%, observa-se que o valor de cinzas totais obtidos para o pó das folhas de *C. icaco* está compatível com a legislação estabelecida (NAVARRO et al, 2008).

Aguiar (2010), ao analisar as folhas de *C. icaco* encontrou valor de  $4,61\% \pm 0,13$  para teor de cinzas totais; semelhante ao encontrado no presente estudo. Estes resultados sugerem que houve correta colheita, higienização e processamento do material vegetal usado nos referidos estudos.

#### 5.5.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS INSOLÚVEIS EM ÁCIDO

As cinzas insolúveis em ácido constituem o resíduo remanescente após fervura de cinzas totais ou sulfatadas com ácido clorídrico diluído após filtragem;

lavagem e incineração. O método destina-se à determinação de sílica e constituintes silícicos da droga (FARMACOPÉIA, 2000).

A média e desvio padrão da porcentagem de cinzas insolúveis em ácido para o EHCi, em relação à droga seca ao ar, foi 1,67%  $\pm$  0,0012. Este resultado encontra-se dentro do máximo permitido, que é 3%, estipulado pela Farmacopéia (2000) e sugere que as amostras não foram contaminadas por material estranho. Não há monografia da planta, nem foi encontrado nenhum trabalho para comparações. Portanto, este valor obtido para cinzas insolúveis, além de ser o primeiro, constitui-se em um parâmetro para o controle de qualidade da referida droga vegetal.

#### 5.5.7 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE EXTRATIVOS

A determinação do teor de extrativos é um método quantitativo usado para determinar constituintes extraíveis da droga vegetal, que pode ser considerado como uma característica própria, assim como pode auxiliar na avaliação da qualidade dessa droga vegetal. O teor de extrativos de *C. icaco* usando ácido clorídrico foi realizado em triplicata, com média e desvio padrão dispostos na Tabela 3 (p.74).

Tabela 3 - Média e desvio padrão expressos em grama (g) para o teor de extrativos do pó das folhas do *Chrysobalanus icaco* L.

Parte da espécie	Média	Desvio padrão
Folhas de <i>C. icaco</i>	1,3 g	$\pm$ 0,001 g

#### 5.5.8 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE ESPUMA

Conforme a classificação existente na Farmacopéia Brasileira (2010), se em qualquer um dos tubos, a altura da espuma medida for um centímetro, a diluição do material vegetal nesse tubo (A) é o índice observado. Como no presente estudo, o tubo de número nove apresentou um centímetro de altura de espuma, o índice de espuma encontrado foi de  $111,11 \text{ cm} \pm 0,0013$ . Não foi encontrado nenhum registro para o índice de espuma das folhas de *C. icaco* para comparar com o resultado obtido neste estudo, portanto o mesmo se constitui no primeiro valor relatado para índice de espuma desta espécie.

Observa-se ainda, que o índice de espuma não varia com a sazonalidade, logo se isto puder ser estendido a todas as espécies vegetais, este pode se constituir em um parâmetro usado na determinação de qualidade da droga vegetal (CHICOUREL et al, 1997/1998; BORELLA et al, 2006).

#### 5.5.9 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE RESÍDUO SECO

A média encontrada de resíduo seco do extrato de *C. icaco* após o procedimento foi de 0,4863 g, com desvio padrão de  $\pm 0,0023 \text{ g}$ , o que corresponde em porcentagem de massa a uma média de 97% de extrato residual. Este resultado indica que o extrato em estudo pode ser considerado extrato seco, visto que apresentou teor de resíduo seco acima de 95%, mínimo estabelecido pela Farmacopéia Brasileira (2010).

### 5.6 Abordagem Fitoquímica

Essa análise teve como objetivo o conhecimento de grupos químicos, tais quais: cumarinas, heterosídeos, fenólicos simples, saponinas, taninos, alcalóides, flavonóides, antocianidinas (BARBOSA et al, 2001). No presente estudo, a abordagem fitoquímica apresentou os resultados dispostos abaixo (Quadro 1, p.76).

Reagentes	Classe de substâncias detectadas	Folhas
(*)	Saponinas	+
Reativo de Pascová	Ácidos Orgânicos	+
Reativo de Fehling	Açúcares Redutores	+
Lugol	Polissacarídeos	IND
Nihidrina	Proteínas e Aminoácidos	+
Cloreto Férrico	Fenóis e Taninos	+
HCL concentrado e raspas de Magnésio	Flavonóides	+
Bouchardat	Alcalóides	-
Dragendorf	Alcalóides	-
Mayer	Alcalóides	-
NH <sub>4</sub> OH 6N	Purinas	+
Nitroprussiato de Sódio e NaOH 2N	Glicosídeos Cardíacos	-
Vanilina e HCL concentrado	Catequinas	+
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> a 25%, Formaldeído a 4% e O-dinitrobenzeno a 5%	Sesquiterpenolactonas	+
Anidrido Acético e Ácido Sulfúrico Concentrado	Esteróides e Triterpenóides	+
Ácido Trifluoroacético	Carotenóides	+
Cloreto férrico a 1%	Depsídios e Depsidonas	+
NaOH 1N	Derivados da Cumarina	-
NH <sub>4</sub> OH a 10%	Antraquinonas	-

Quadro 1 - Resultados das reações indicativas da presença (+) ou ausência (-) de constituintes químicos de *Chrysobalanus icaco* L.

Legenda: (\*): Método espumídico; IND: indeterminado.

No presente estudo, o extrato das folhas do *C. icaco* apresentou resultado positivo para saponinas espumídicas. Estas substâncias são constituintes químicos que possuem propriedade de redução da tensão superficial da água, o que lhes conferem ação detergente e emulsificante (CORNÉLIO et al, 2003).

As saponinas são metabólitos vegetais, glicosídeos esteróides ou terpenos policíclicos, que na sua forma estrutural possuem uma parte lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra hidrofílica (açúcares), esta característica determina suas

propriedades já citadas; às saponinas, também tem sido relatada atividade antifúngica (BORELLA et al, 2006).

Nos testes fitoquímicos realizados, o extrato das folhas do *C. icaco*, apresentou testes positivos para flavonóides, fenóis e taninos. O amplo espectro de ação antimicrobiana de espécies vegetais já foi associado à maior quantidade de polifenóis e flavonóides totais encontrados nas mesmas (REIS, 2006; GUEDES et al, 2009).

Os flavonóides são compostos bioativos que podem atuar como antioxidantes moduladores da atividade enzimática, reguladores de respostas inflamatórias e imune do organismo humano, entre outros; e estar associados com a redução do risco de câncer e doenças cardiovasculares (AGUIAR, 2010). Os resultados encontrados através da abordagem fitoquímica realizada no presente estudo confirmam a presença de flavonóides no EHCi. Em outros estudos já houve a identificação desta classe de substâncias, inclusive com a possibilidade de que a Miricetina, um dos flavonóides encontrados, possa funcionar como marcador taxonômico (MENDEZ et al, 1995; FERNANDES et al, 2003; BARBOSA et al, 2006).

A abordagem fitoquímica realizada para o extrato hidroalcoólico de *C. icaco* indicou também a presença de proteínas e aminoácidos, purinas, depsídeos e depsídonas, catequinas, esteróides e triterpenóides. Estes resultados corroboram com o isolamento de diterpenos e triterpenos, assim como, com a assertiva de que o metabolismo especial da família *Chrysobalanaceae* caracteriza-se pela presença de diterpenóides, triterpenóides, esteróides, flavonóides e taninos (FERNANDES et al, 2003; CASTILHO et al, 2005).

A análise das substâncias químicas presentes no extrato das folhas de *C. icaco* sugere ausência de alcalóides, antraquinonas, glicosídeos cardíacos, polissacarídeos. Contudo, a mesma não possui caráter autolimitante, há necessidade de testes mais específicos para determinação e até mesmo, isolamento de substâncias presentes no EHCi. Esta afirmativa apoiá-se no fato de que o teor de constituintes vegetais é determinado por vários fatores, dentre estes, a época da coleta, o clima, o tipo de extrato obtido, a constituição do solo e a idade da planta (COUTO, 2005).

## **5.7 Análise do EHCi por CLAE**

Após a interpretação dos cromatogramas obtidos por CLAE, observaram-se espectros de UV com máxima de absorção entre 253 e 355 nm, constatando o predomínio de flavonóides na composição do extrato hidroalcoólico de *C. icaco* (Figura 19). A identificação de flavonóides foi realizada através da comparação de tempos de retenção de padrões analíticos.

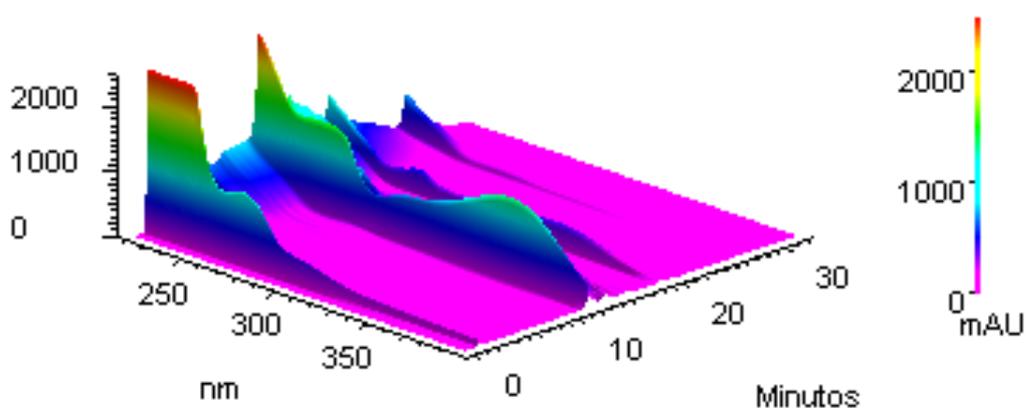


Figura 19: Espectro de UV do pico 01, mostrando os máximos de absorção característicos de flavonóides (253 e 355 nm).

Observou-se ainda, no cromatograma abaixo (Figura 20) um pico predominante, com absorvância de 1300 mAU e tempo de retenção de 12 minutos que corresponde à Miricetina, já detectada em estudos anteriores, onde foi sugerido que a presença desta substância poderia ser usada como marcador fitoquímico (MENDEZ et al, 1995; FERNANDES et al, 2003; BARBOSA et al, 2006).

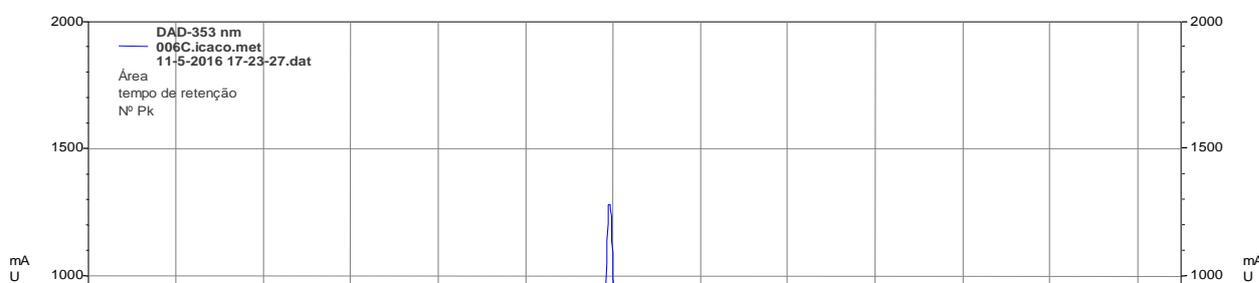


Figura 20: Cromatograma do EHCi, mostrando pico de Miricetina (pico 01).

## 5.8 Distribuição e identificação das leveduras

Em virtude das espécies de *Candida* serem microrganismos comensais da cavidade bucal, e à variabilidade clínica das candidíases, não se trabalhou com indivíduos sintomáticos, pois para padronização do grupo em estudo, seria necessário um tempo maior e exames complementares para confirmar o diagnóstico clínico do tipo de candidíase.

De um universo de 50 pacientes entrevistados, 29 (58%) encontravam-se dentro dos critérios de inclusão do presente estudo. Dentre os 29 pacientes selecionados, apenas 20 (68,96%) apresentaram culturas positivas para leveduras, grupo este, constituído por mulheres com idade variando entre 32 e 51 anos.

Após bacterioscopia com coloração de GRAM, apenas em 12 (41,37%), foi confirmada a presença de leveduras; destas, uma cepa foi descartada após teste de viabilidade, perfazendo um total de onze cepas enviadas para identificação.

As cepas usadas no presente estudo, após teste de viabilidade, foram nomeadas em C1 a C11, para os isolados orais de *Candida* spp. Os isolados orais foram identificados pelo IEC através do sistema VITEK II.

Em relação ao sistema VITEK II (bioMérieux) usado na identificação das espécies de *Candida*, não há dúvidas de que é um método seguro mesmo quando comparado aos testes moleculares, com resultados disponíveis ao fim de aproximadamente 18 horas (PEREIRA, 2010). Consiste em um método automático que executa testes de identificação e susceptibilidade usando cartas de leveduras YST<sup>®</sup>, baseadas em métodos bioquímicos conhecidos; as cartas possuem 46 testes bioquímicos que medem a utilização de fonte de carbono, da fonte de azoto e a atividade enzimática (PEREIRA, 2010).

Habitualmente, tanto em indivíduos sadios ou não, *Candida albicans* tem sido a mais isolada (KRCMERY e BARNES, 2002; MANO et al, 2004). Entretanto, no presente estudo, 63,64% dos isolados foram identificados como *Candida* não *albicans* e 36,36% como *Candida albicans* (Quadro 2, p.80). A mudança de perfil epidemiológico das Candídiases, onde espécies não *albicans* têm prevalecido, já foi relatada em outros estudos, tendo sido associada com o aumento de procedimentos médicos invasivos, bem como a profilaxia e uso empírico de antifúngicos, como os azóis (COLOMBO et al, 2002; GOLDANI e MARIO, 2003; ANTUNES et al, 2004; DURÁN et al, 2005).

Isolado Oral	Espécie
C1	<i>Candida tropicalis</i>
C2	<i>Candida parapsilosis</i>
C3	<i>Candida albicans</i>
C4	<i>Candida parapsilosis</i>
C5	<i>Candida albicans</i>
C6	<i>Candida albicans</i>
C7	<i>Candida albicans</i>
C8	<i>Candida parapsilosis</i>
C9	<i>Candida parapsilosis</i>
C10	<i>Candida parapsilosis</i>
C11	<i>Candida dubliniensis</i>

Quadro 2 - Classificação das espécies após identificação, segundo ordem de coleta dos isolados orais.

## 5.9 Atividade antifúngica do EHCi

Para a determinação da CIM de EHCi foi usada a técnica de microdiluição em caldo segundo a norma M27-A2 (NCCLS, 2002), com modificações (QUADROS et al, 2011). Atualmente, este ensaio quantitativo tem sido usado com mais frequência, visando à padronização dos ensaios microbiológicos para fins de comparação posterior (OSTROSKY et al, 2008). Citam-se como vantagens da microdiluição, a possibilidade de usar tanto amostras hidrossolúveis como lipossolúveis, ser quantitativa, usar menor quantidade de extrato, além, de apresentar maior sensibilidade comparada a outros métodos (TRABULSI, 1999; OSTROSKY et al, 2008).

O emprego em conjunto da solução do sal de tetrazólio 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) auxilia na melhor visualização da atividade fúngica, visto que, ao reduzir o sal de tetrazólio a cristais de MTT – formazan, através da ação mitocondrial da succinil desidrogenase, ocorre alteração de cor, de amarela para azul (MOISMANN, 1983). Contudo, no presente estudo o uso do MTT para análise visual, não apresentou resultados conclusivos, o que pode ser atribuído à coloração e composição do EHCi, por conseguinte, foi usada a leitura das unidades formadoras de colônias, para determinação da CIM e CFM. Este método tem sido empregado em outros estudos, onde a CIM e CFM não pode ser avaliada pela análise visual com MTT.

A dificuldade na interpretação visual da microdiluição tem sido atribuída à deposição de compostos nos poços e à alta prevalência de clorofila, em alguns extratos vegetais (ELOFF, 1998). No presente estudo, a deposição de compostos foi contornada através da homogeneização de cada poço pela pipetagem prévia à leitura dos resultados; já a desclorofilação sugerida em outros trabalhos, não foi realizada no presente estudo, ficando como prerrogativa para os trabalhos subseqüentes que visem à atividade antimicrobiana de *Chrysobalanus icaco*.

A identificação da espécie com os valores de CIM e CFM dos onze isolados orais e da ATCC 40175, encontram-se especificadas na Tabela 4 (p.82).

Tabela 4 - Valores de CIM e CFM expressos em mg/mL para isolados orais e ATCC 40175.

Cepa	Espécie	CIM	CFM
C1	<i>C. tropicalis</i>	> 6,25	ND
C2	<i>C. parapsilosis</i>	3,12	6,25
C3	<i>C. albicans</i>	6,25	> 6,25
C4	<i>C. parapsilosis</i>	> 6,25	ND
C5	<i>C. albicans</i>	> 6,25	ND
C6	<i>C. albicans</i>	> 6,25	ND
C7	<i>C. albicans</i>	3,12	> 6,25
C8	<i>C. parapsilosis</i>	> 6,25	ND
C9	<i>C. parapsilosis</i>	> 6,25	ND
C10	<i>C. parapsilosis</i>	6,25	> 6,25
C11	<i>C. dubliniensis</i>	6,25	> 6,25
C12	<i>C. albicans</i> (ATCC 40175)	< 1,56	1,56

CIM - concentração inibitória mínima; CFM- concentração fungicida mínima; ND- não determinado.

O EHCi apresentou CIM maior que 6,25 mg/mL frente à *Candida tropicalis* (Figura 21, p. 82). A CFM frente a esta mesma espécie não foi determinada, sendo maior que 6,25 mg/mL.

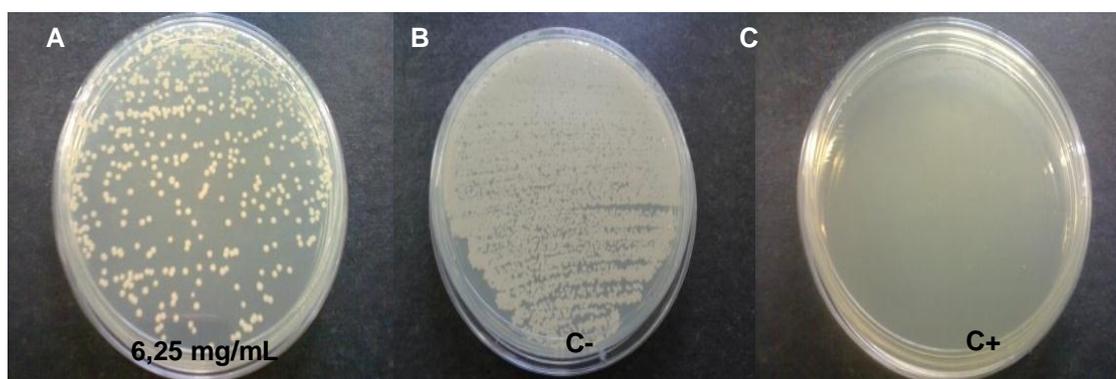


Figura 21: Padrão de crescimento de *Candida tropicalis* (C1) frente ao EHCi a 6,25 mg/mL (A), ao Controle Negativo (B) e ao Controle positivo (C).

Nos ensaios microbiológicos de EHCi frente à *Candida parapsilosis*, a CIM foi de 3,12 mg/mL (Figura 22, p.83) em 20% das amostras clínicas (C2), igual a 6,25 mg/mL (C10) em 20% (Figura 23, p.83) e maior que 6,25 mg/mL (C4, C8 e C9) em 60% dos isolados (Figura 24, p.84). A CFM não foi determinada para a maioria dos isolados de *C. parapsilosis*; sendo igual a 6,25 mg/mL em C2.

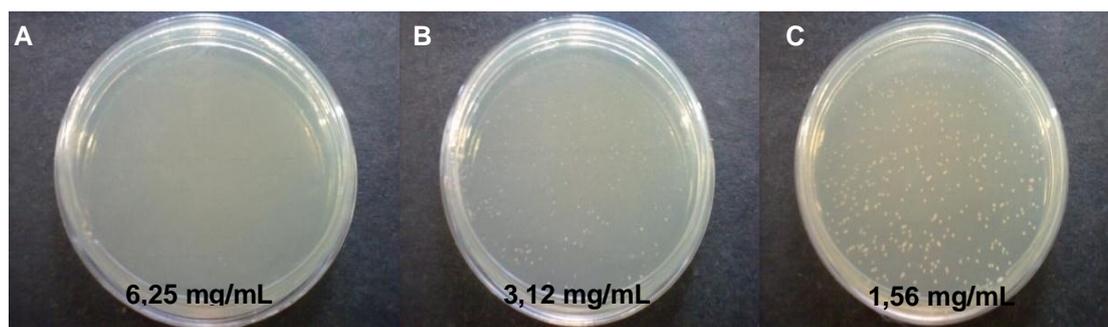


Figura 22: Padrão de crescimento de *C. parapsilosis* (C2): CIM igual a 3,12 mg/mL(B) e CFM igual a 6,25 mg/mL (A).

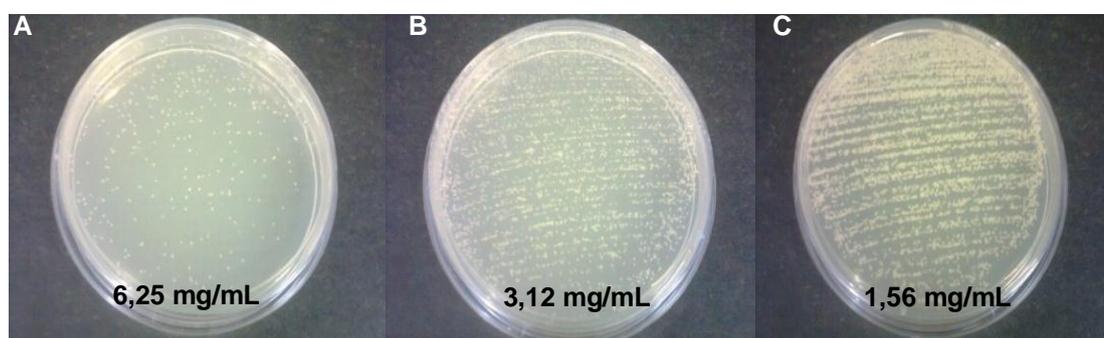


Figura 23: Crescimento de *C. parapsilosis* (C10): CIM igual a 6,25 mg/mL (A).

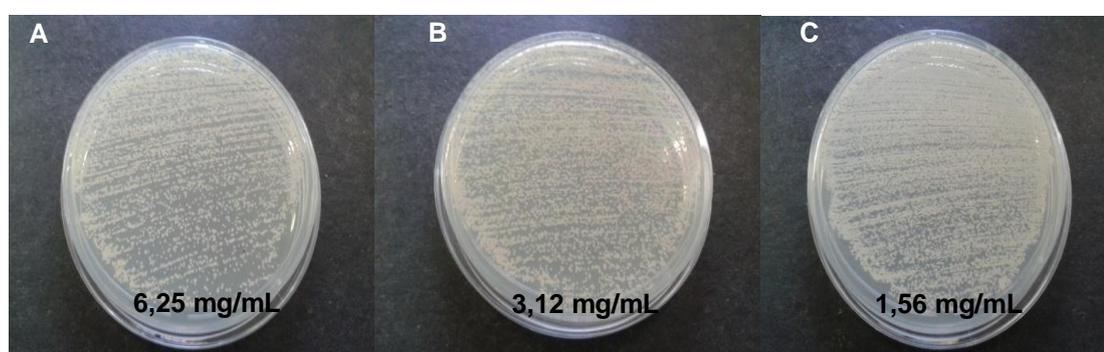


Figura 24: Padrão de crescimento de *C. parapsilosis* (C4): CIM > que 6,25 mg/mL.

Quando testado frente à *Candida dubliniensis* (C11), o EHCi apresentou CIM igual a 6,25 mg/mL e CFM maior que 6,25 mg/mL, quando comparados ao controle positivo e negativo (Figuras 25a e 25b, p.84).

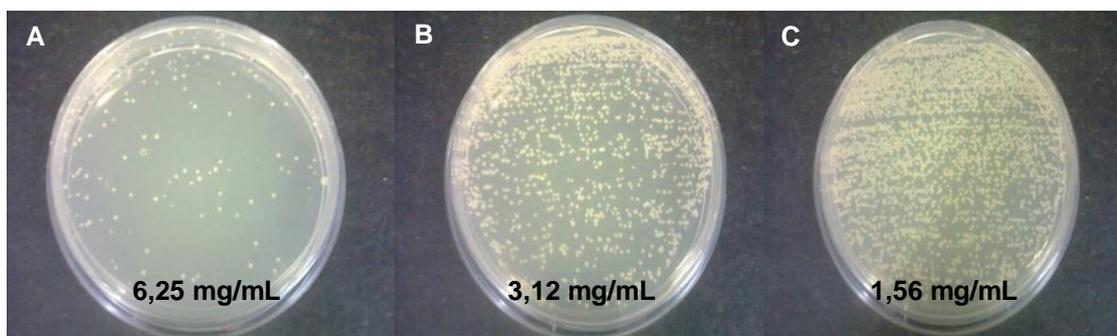


Figura 25a - Crescimento de C11 (*C. dubliniensis*), em três diferentes concentrações expressas em mg/mL.

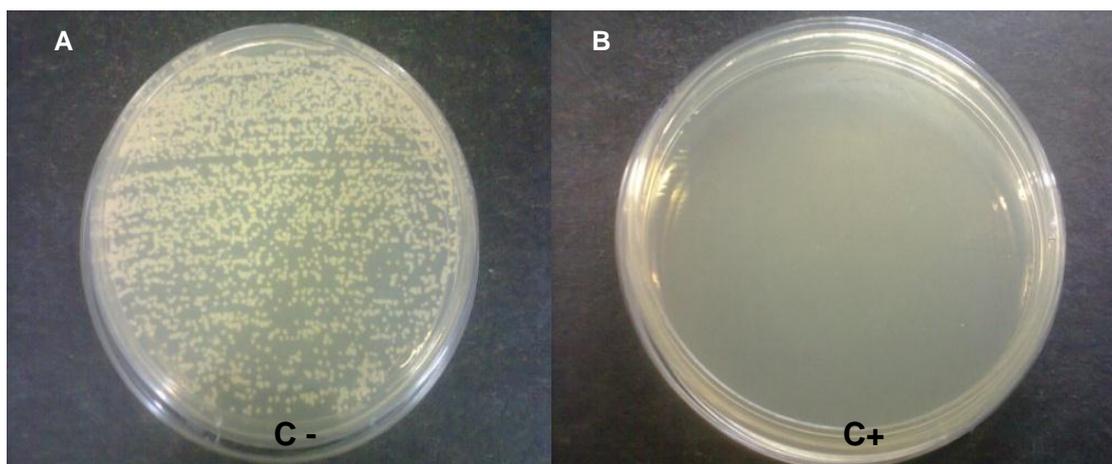


Figura 25b – A: Controle Negativo - DMSO a 2,5%; B: Controle positivo - Nistatina 50.000 UI/mL para *Candida dubliniensis*.

Em isolados orais de *Candida albicans*, a CIM foi maior que 6,25 mg/mL (C5 e C6), igual a 6,25 mg/mL (C3) e igual 3,12 mg/mL (C7). Essa variação pode ser observada nas figuras 26, 27 e 28, respectivamente (p.85). A CFM não foi identificada, sendo maior que 6,25 mg/mL para todas as cepas clínicas de *Candida albicans*.

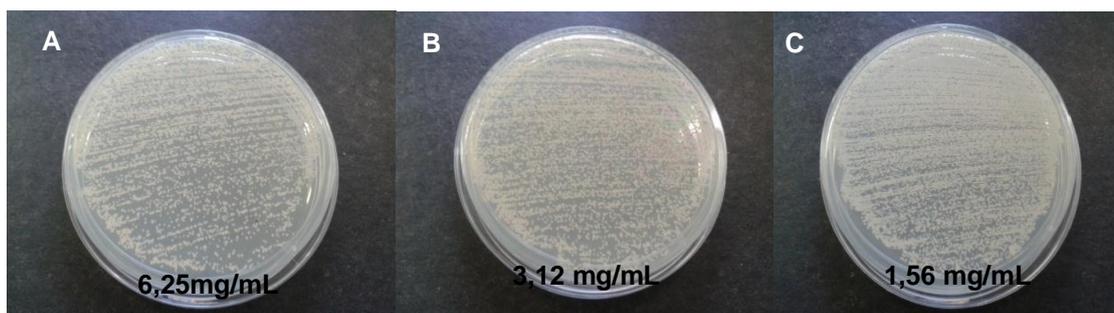


Figura 26 - *Candida albicans* (C5) frente ao EHCi com CIM > 6,25 mg/mL.

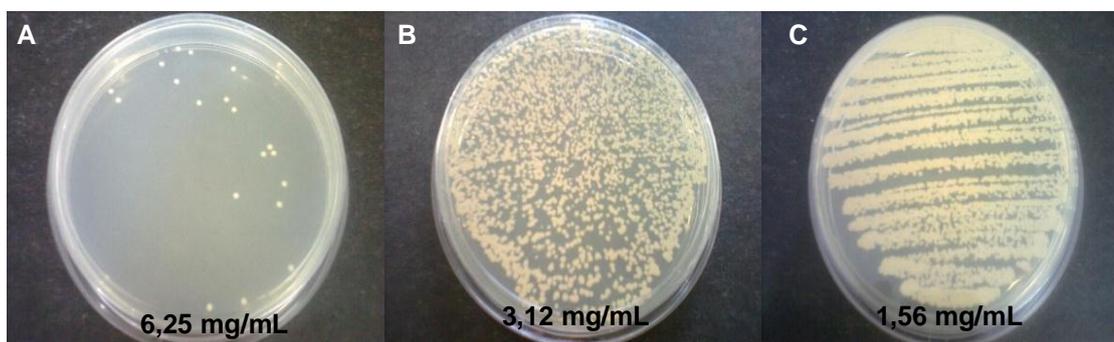


Figura 27 - *Candida albicans* (C3) frente ao EHCi com CIM igual a 6,25 mg/mL e CFM > 6,25 mg/mL.

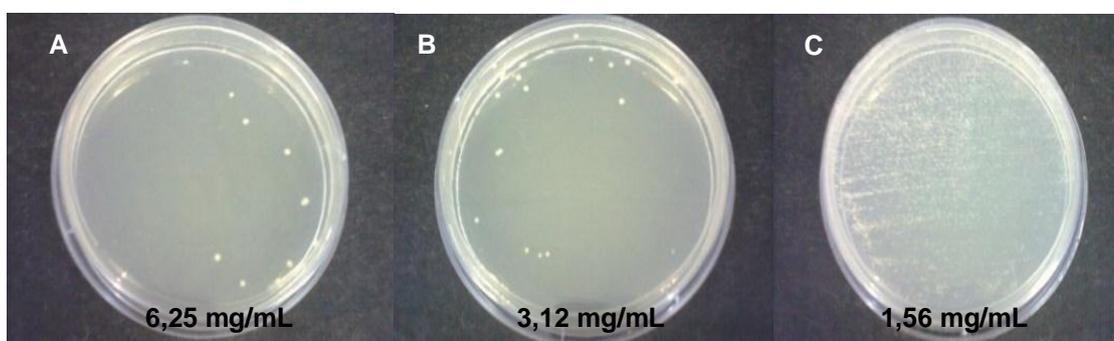


Figura 28 - *Candida albicans* (C7) frente ao EHCi com CIM igual a 3,12 mg/mL e CFM > 6,25 mg/mL.

3,12 mg/mL

Para a ATCC 40175 de *Candida albicans* obteve-se CIM menor que 1,56 mg/mL e CFM igual a 1,56 mg/mL em comparação aos seus controles positivo e negativo (Figura 29, p.86). A análise destes resultados evidencia que a CIM da cepa ATCC foi menor, quando comparada aos isolados clínicos de *Candida albicans*; o que coaduna com evidências de que as cepas ATCC exibem menor variabilidade genética, portanto, geralmente são mais sensíveis (LACAZ et al, 2002)

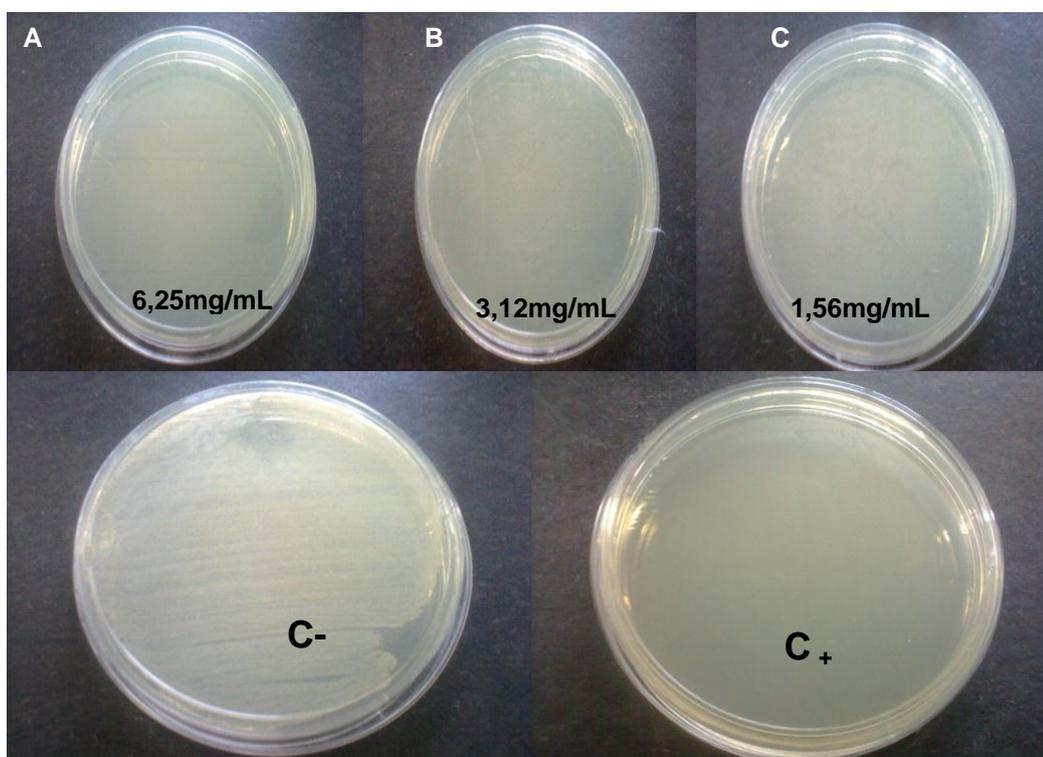


Figura 29 - *Candida albicans* (ATCC 40175) nas concentrações de 6,25 mg/mL(A), 3,12 mg/mL (B) e 1,56 mg/mL (C); (C-): DMSO a 2,5% (D) e (C+): Nistatina a 50.000 UI/mL (E).

A atividade antifúngica de *C. icaco* frente à *Candida albicans* já havia sido relatada em estudos usando o extrato hexânico das folhas desta espécie vegetal e de *Eugenia randiflora*, outra espécie da família *Chrysobalanaceae* (CASTILHO et al, 2000). Entretanto, não foram citados valores de CIM e CFM, nem o método empregado e parâmetros usados na análise antifúngica (CASTILHO et al, 2000).

Em ensaios posteriores, os extratos metanólico, hexânico e frações a 50 mg/mL de *C. icaco* não foram ativos frente à *Candida albicans*, quando aferidos através do método de disco difusão (CASTILHO e KAPLAN, 2011).

A falta de padronização de testes de suscetibilidade antimicrobiana tem sido um dos entraves encontrados para a realização e comparação desse tipo de estudo (HOOD et al, 2003).

Não existe um consenso em relação ao nível de inibição aceitável para produtos naturais quando comparados aos antibióticos padrões, tanto que alguns autores consideram somente resultados similares aos antibióticos, enquanto outros

consideram com bom potencial mesmo aqueles com níveis de inibição superiores (DUARTE et al, 2005)

No presente estudo, a atividade antifúngica foi classificada em forte quando CIM até 0,5 mg/mL, moderada (entre 0,5 mg/mL e 1,5 mg/mL) e fraca quando maior do que 1,5 mg/mL (ALIGIANNIS et al, 2001; SARTORATTO et al, 2004). Logo, o EHCi apresentou fraca atividade em todas as espécies de *Candida* usadas nos ensaios microbiológicos, com exceção para a ATCC 40175, onde o mesmo foi moderadamente ativo.

A ação fungistática de EHCi determinada nestes ensaios não implica que o mesmo não possua substâncias em sua composição que apresentem ação fungicida; portanto há necessidade de que se investigue a atividade antifúngica de partições ou substâncias isoladas de EHCi, entre estas, flavonóides, taninos e saponinas, que apresentam grande potencial antimicrobiano (REIS, 2006; GUEDES et al, 2009).

A necessidade de novos ensaios que determinem a CIM e CFM de substâncias isoladas desta droga vegetal, assim como, outros ensaios que avaliem o EHCi em maiores concentrações paralelos a ensaios toxicológicos e investigações sobre o seu mecanismo de ação são imprescindíveis na viabilidade de uso seguro de *Chrysobalanus icaco* na terapêutica antifúngica, visto que a maioria dos antifúngicos convencionais possuem ação fungistática e têm sido usados no tratamento de infecções fúngicas.

## 7 CONCLUSÕES

- Com base em dados, Farmacopéicos e não Farmacopéicos constata-se que as análises qualitativas e quantitativas de autenticidade e pureza do pó das folhas de *C. icaco*, estão em acordo com os parâmetros de qualidade estabelecidos para drogas vegetais;
- A droga vegetal apresenta teor de perda por dessecação dentro dos parâmetros estabelecidos pela Farmacopéia Brasileira, indicando que os procedimentos de colheita e pós-colheita são adequados e garantem boa conservação e secagem eficiente da matéria-prima vegetal;
- Os resultados obtidos na abordagem fitoquímica confirmam o grande potencial terapêutico do EHCi;
- O extrato hidroalcoólico de *Chrysobalanus icaco* apresentou atividade antifúngica moderada frente à cepa ATCC de *C. albicans* e fraca atividade antifúngica nos isolados clínicos orais de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*.
- *Chrysobalanus icaco* pode ser usado na terapêutica antifúngica frente à *Candida* spp, desde que ensaios toxicológicos determinem o seu emprego seguro;
- Os resultados da atividade antifúngica EHCi frente à *Candida* spp, usando a microdiluição em caldo, são pioneiros e abrem perspectivas para novos estudos que investiguem a ação biológica de substâncias isoladas a partir do mesmo.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, T. M. **Caracterização química e física de folhas, frutos e sementes do bajuru (*Chrysobalanus icaco*, L.) e avaliação do chá dessas folhas em camundongos (*suiss*) normais e diabéticos.** 2010. 171 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2010.
- ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **J Agric Food Chem**, 40: 4168-4170, 2001.
- ALVES, P.M. et al. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn. (goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação *in vitro*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16. n. 2, p. 192-196, 2006.
- AMARAL, M.F.Z. J.; BARA, M. T. F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 5-8, 2005.
- ANDRIOLE, V.; REMINGTON, J.; SWARTZ, M. Current and future therapy of invasive fungal infections. **Curr Clin Topics Infect Dis**, Blackwell Sciences, 18: 19-36, 1998.
- ANTUNES, A.G.V. et al. Candidemia in a Brazilian Tertiary care Hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. **Rev Inst Med Trop**, São Paulo, 46(5): 239-4, 2004.
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC nº 48, de 16 de março de 2004, disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/rdc>. Acesso em 20/12/2010.
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RE nº 1185, de 09 de julho de 2002, disponível em [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/1185\\_02re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/1185_02re.htm). Acesso em 05/11/2010.
- ARANGO, M.A.C.; SANCHEZ, B.J.G.; GALVIS, B.L.A. Productos naturales com actividad antimicótica. **Rev Esp Quimioterap**, 17(4): 325-31, 2004.
- ARAÚJO, J.C.L.V. et al. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microorganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Rev Patol Trop**, 33:55-64, 2004.
- ARAÚJO, A.L.A. et al. Perfil da Assisiência Farmacêutica na Atenção Primária do SUS. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.13, p. 611-17, 2008.
- BARBOSA, W.L.R; PERES, A.; GALLORI, S.; VINCIERI, F.F. Determinação de derivados de miricetina em *Chrysobalanus icaco* L. (*Chrysobalanaceae*) **Rev Bras Farmacogn**, João Pessoa, vol.16, nº 3 July/Sept. 2006.

BARBOSA, W.L.R. et al. Manual para a Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais. **Revista Científica da UFPA**, Belém-PA, 2001.

BARBOSA, W.L.R.; PERES, A. Detecção e caracterização por cromatografia líquida de alta eficiência de rutina em extratos de *Chrysobalanus icaco* L. **XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Cuiabá, MT**, 2002.

BASSETTI, M. et al. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. **BMC Infect Dis**, v.10, n.6, p.21-6, Feb., 2006.

BAUMGARTNER, C.; FREYDIERE, A.M.; GILLE, Y. Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using *Albicans* id and CHROMagar *Candida* plates. **J Clin Microbiol**, 34: 454-456, 1996.

BERTINI, L.M. et al. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v. 17, n. 3/4, p. 80-83, 2005.

BORELLA, J.C. et al. Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja) e isolamento de flavona. **Rev Bras Farmacogn**, João Pessoa, vol.16, nº4, oct./dec. 2006.

BRACA, A.; et al., Triterpenes from *Licania licaniaeora*. **Fitoterapia**. 72, 585 -587, 2001.

BRACA, A.; LUNA, D.; MENDEZ, J. Flavonoids from *Licania petala* and *Licania licaniaeora* (*Chrysobalanaceae*). **Biochemical Systematics and Ecolog**, 30, 271-273, 2002.

BRILHANTE, R.S.N. et al. Antifungal susceptibility and genotypical pattern of *Microsporum canis* strains. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 1480-3275, 2005.

BRITO, L.R. et al. Aspectos clínicos e microbiológicos de candidemia devido a *C. parapsilosis* no Brasil em hospitais de atendimento terciário. **Micologia Médica**, 44: 261-66, 2006.

BROWN, S.H.U.S. **Chrysobalanus icaco**. Department of Agriculture, Cooperative Extension Service, University of Florida, IFAS, Florida A. & M. Revised, 1/2011.

BRUMMITT, R.K. Vascular Plants Families and Genera. **Royal Botanic Gardens**, Kew, 1992.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Braz J Med Biol Res**, 33:179-189, 2000.

CAMPAGNOLI, E.B. et al. Candidose, qual o melhor tratamento? **J Bras Clin Odontol Int**, v.8, n.43, p. 72-6, 2004.

CAMPISI, G.; PIZZO, G.; MILICI, M.E. Candidal carriage in the oral cavity of human immunodeficiency virus-infected subjects. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 93: 281-6, 2002.

CANO, M.V. et al. Candidemia in pediatric out patients receiving home total parenteral nutrition. **Med Mycol**, 43(3): 219-225, 2005.

CAPOOR, M.R. et al. Emergence of non-*albicans* *Candida* species and antifungal resistance in tertiary care hospital. **Jpn J Infect Dis**, v.58, n.6, p.344-8, Dec. 2005.

CARVALHO, C.A. **Avaliação do potencial antifúngico, antioxidante e citotóxico dos extratos de *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha)**. 75p. 2007. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade de Ribeirão Preto, 2007.

CASTILHO, R.O. et al. A survey of chemical and biological activities of *Chrysobalanaceae*. **An Acad Bras Cienc**, 72: 292-293, 2000.

CASTILHO, R.O.; KAPLAN. M.A.C. Phytochemical study and antimicrobial activity of *Chrysobalanus icaco*. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 47, nº 3, July, p. 436-437, 2011.

CASTILHO, R.O.; OLIVEIRA, R.R.; KAPLAN. M.A.C. Licanolide, a new triterpene lactone from *Licania tomentosa*. **Fitoterapia**, 76, 562-566, 2005.

CAVASSANI, V.G.S.; ANDRADE SOBRINHO, J.; HOMEN, M.G.N.H. Oral candidiasis as prognostic marker of HIV-infected patients. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v. 68, n.5, p.630-634, Oct. 2002.

CECCHI, H.M. **Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos**. 2ªed. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2003.

CHAMI, N. et al. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.8, n.3, p. 217-226, 2004.

CHATTOPADHYAY, D. et al. Antimicrobial activity of *Alstonia macrophylla*: a folklore of bay islands. **Journal of Ethnopharmacology**, v.77, n. 1, p. 49-55, 2001.

CHAUDHURI, S. et al. Licamichauxiolic - A and-B Acids-twoent - Kaurene Diterpenoids from *Licania michauxii*. **Natural Product Letters**, 16 (1), 39-45, 2002.

CHAVES, J.B.P. **Noções de microbiologia e conservação de alimentos**. Viçosa: UFV, 1993.

CHEN, S.C.; SORREL, T.C. Antifungal agents. **Med J Aust**, v.187, p.404-409, 2007.

CHICOUREL, E.L. et al. Contribuição ao conhecimento analítico de três compostas medicinais. **Rev Bras Farmacogn**, 7/8: 59-66, 1997/1998.

CLARK, T.A. et al. Epidemiologia e caracterização molecular de um surto de *Candida parapsilosis*: infecções da corrente sanguínea em um hospital da comunidade. **J Clin Microbiol**, 42: 4468-4472, 2004.

COLEMAN RINALDI et al. Importância das espécies de *Candida* não *albicans* como patógenos oportunistas. **Mycol Med**, 36(1): 156-165, 1998.

COLOMBO, A.L. Epidemiology and treatment of hematogenous candidiasis: a Brazilian perspective. **Braz J Infect Dis**, 4:113-8. 2000.

COLOMBO, A.L. et al. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian Tertiary care Hospital. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 34(4): 281-286, 1999.

COLOMBO, A.L. et al. Dados brasileiros de susceptibilidade ao Fluconazol em isolados avaliados por um método de difusão em disco. **BJID**, 6(3): 118-23, 2002.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp*. **Rev Soc Bras Med Trop**, 36: 599-607, 2003.

CORNÉLIO, M.L.; BERNARDINO, M.J.; MOUCO, G. Controle de qualidade de *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedra). **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Edição nº. 31, Jul./Dez. 2003.

COUTO, A.G. **Desenvolvimento tecnológico de comprimidos a partir do granulado do produto seco por aspersão de *Phyllanthus niruri* L. e controle de qualidade da matéria-prima vegetal a partir de seu cultivo**. 456p. 2005. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2005.

COWEN, L.E.; ANDERSON, J.B; KOHN, L.M. Evolution of drug resistance in *Candida albicans*. **An Rev Microbiol**, 56: 139-65, 2002.

COX, S.D. et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v.88, n.1, p.170-175, 2000.

CROCCO, E.I. et al. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica in vitro: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. **An Bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v.79, n. 6, p.689-697, nov./dez. 2004.

DAHLGREN, R.M.T. A revised system of classification on the angiosperms. **Botanical Journal of Linnean Society**, v.80, n.2, p.91-124, 1982.

DE REPENTIGNY, L. et al. Characterization of binding of *Candida albicans* to small intestinal mucin and its role in adherence to mucosal epithelial cells. **Infect Immun**, 68: 3172-9, 2000.

DIEKEMA, D.J. et al. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. **J Clin Microbiol**, 40, 1298-1302, 2002.

DIGNANI, M.C.; SOLOMKIN, J.S.; ANAISSIE, E. Candida. In: ANAISSIE, E.; MCGINNIS, M. R.; PFALLER, M. A. **Medical Mycology**. 1ª Edição. Churchill Livingstone, Filadélfia, p. 195-239, 2003.

DUARTE, M.C.T. et al. Anti-*Candida* activity of essential oils and extracts from native and exotic medicinal plants used in Brazil. **Journal of Ethnopharmacol**, v.97, p. 305-311, 2005.

DÚRAN, E. et al. Candidemia: *Candida parapsilosis* em uma unidade de neonatologia. **Rev Iberoamer Micol**, 22: 64, 2005.

ELLIS, D. Amphotericin B: spectrum and resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 49, suppl. S1, p. 7-10, 2002.

ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v.64, p.711-713, 1998.

ESPINEL-INGROFF, A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. **Rev Iberoam Micol**, v. 25(3), p.101-106, 2008.

FARIAS, N; BUFFON, M.; CINI, R. In *vitro* evaluation of antifungal action of chlorhexidina digluconate and nystatin on the growing control of *Candida albicans*. **Visão Acadêmica**. Curitiba, 4: 83 – 88, 2003.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed. Parte I. São Paulo: Atheneu, 1988.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed. Parte II. São Paulo: Atheneu, 2000.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5.ed. Parte I e II. São Paulo: Atheneu, 2010.

FENNER, R. et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Braz J Pharm Sci**, 42(3): 369-394, 2006.

FERNANDES, J. et al. Pentacyclic triterpenes from *Chrysobalanaceae* species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines. **Cancer Letters**, Irlanda, v. 190, p.165- 169, 2003.

FERREIRA, M.E. et al. The ergosterol biosynthesis pathway, transporter genes, and azol e resistance in *Aspergillus fumigates*. **Med Mycol**, v.43, p.313-319, 2005.

FERREIRA-MACHADO, S.C. et al. Genotoxic potentiality of aqueous extract prepared from *Chrysobalanus icaco* L. leaves. **Toxicology Letters**, Netherlands, v.151, p. 481-487, 2004.

FERRO, D. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. São Paulo: Atheneu, 2006.

FLOONGLADDA, S.; HAOUHAM, P.; SAKULMAIWATANA, P., CHAIPRASERT, A. Comparative evaluation of *Candida* Select test and conventional methods for identification of *Candida albicans* in routine clinical isolates. **Mycoses**, 45:75-78, 2002.

FOUST, A.S. et al. **Princípios das Operações Unitárias**. 3ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

FRANCIS, J. ***Chrysobanalus icaco*, L. coco-plum**. Forest Service of United States Department of Agriculture (USDA), 2003. Acessado em 25 de outubro de 2010. Disponível em <http://www.fs.fed.us/global/iitf/pdf/chrysobanalus%20icaco20L.pdf>.

FRANCO, B. D. de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 1996.

FREITAS, T.; LOCATELLI, E. **Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil**, 13 a 17 de Setembro de 2009, São Lourenço – MG, pg.1-3, 2009.

FURLANETO-MAIA, L. et al. Estudo da incidência de amostras clínicas do gênero *Candida* isoladas de diversos sítios anatômicos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. **Acta Sci Health**; Maringá, 29(1): 33-37, 2007.

GALVÁN, B.; MARISCAL, F. Epidemiologia de la candidemia em UCI. **Rev Iberoam Micol**, 23:12-15, 2006.

GARO, E. et al. Absolute configuration of a ditetrapene lactone from *Parinari capensis*. **Helvetica Chimica Acta**, v.80, p. 538-544, 1997.

GATTASS, C.R. et al. Pentacyclic triterpenes from *Chrysobalanaceae* species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines. **Cancer Letters**, Irlanda, v. 190, p.165-169, 2003.

GESSLER, M.L. et al. Traditional healers in Tanzânia: the treatment of malaria with plants remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v.48, p.119-180, 1995.

GODOY, P. et al. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida spp* bloodstream isolates from Latin American hospitals. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 98(3): 401-405, 2003.

GOLDANI, L.Z.; MARIO, P.S. *Candida tropicalis*: fungemia em um hospital de nível terciário. **J Infect**, 46: 155-60, 2003.

GOLDMAN, G.H. et al. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* isolates from HIV-infected patients in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.50, p.25-32, 2004.

GOODWIN, S.D. et al. Pretreatment regimens for adverse events related to infusion of amphotericin B. **Clin Infect Dis**, v.20, p.755-761, 1995.

GUEDES, R.C.M. et al. Atividade antimicrobiana de extratos brutos de *Petiveria alliacea* L. **Lat Am J Pharm**, 28(4): 520-4, 2009.

GUSTAFSON, K.R. et al. HIV inhibitory natural products 3-diterpenes from *Homalonthus acumonathus* and *Chrysobalanus icaco*. **Tetrahedron**, v.47, n.26, p. 4547-4554, 1991.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.53, n.6, p.1081-1085, 2004.

HAWKES, S.J. The Concept of Density, **J Chem Educ**, v. 81, n. 1, p.14-15, 2004.

HAZEN, K.C. New and emerging yeast pathogens. **Clinical Microbiology Review**. Washington DC, v. 8, p.462-478, 1995.

HEINRICH, R. Drug compliance in elderly patients. **Krankenpfl J**, 38(5): 182, 2000.

HEYDER, C.D.; SILVA, D.A.K. Avaliação da atividade antifúngica do óleo volátil de *Cymbopogon citratus* sobre *C. Krusey* e *C. parapsilosis*. **Rev Saúde e Ambiente**, v.2, n.2, dez., 2004.

HOOD J.R.; WILKINSON, J.M.; CAVANAGH, H.M.A. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. **J Essent Oil Res**, 15: 428-433. 2003.

IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4ª ed., 1º Ed. Digital, v.1, São Paulo – SP, 2008, 1020p.

JARDIM, M.A.G.; SILVA, J.C.Ç.; COSTA-NETO, S.V. Populary fitoterapy and secondary metabolits in vegetable species of Algodual Island country of Maracanã, Pará State, Brazil preliminary results. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 86, n. 3, p. 117-118, 2005.

JOHANN, S. et al. Antifungal properties of plants used in Brazilian, traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. **Braz J Microbiol**, v.38, p.632-637, 2007.

KLEIN, T. et al. Fitoterápicos: um mercado promissory. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, 30(3): 241-248, 2009.

KONTOYANNIS, D.P. et al. Risk factors for *Candida tropicalis* fungemia in adult patients with cancer. **Clin Infect Dis**, v. 33, n. 10, p. 1676-1681, 2001.

KRCMERY, V.; BARNES, A. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **The Journal of Hospital Infection**, New York, v. 50, p. 243-260, 2002.

KRUEL, V.S.F.; PEIXOTO, A.L. Etnobotânica na reserva extrativista marinha de Arraial do Cabo, RJ, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, Porto Alegre, v. 18, n. 1, p. 177-190, 2004.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The yeast: A taxonomic study**. 4<sup>a</sup> ed., Amsterdam: Elsevier, 1998.

LACAZ, C.S. et al. **Tratado de microbiologia médica**. São Paulo: Sarvier, 2002.

LACET et al. Propriedades Farmacológicas do decocto da *Licania rígida* Benth (*Chrysobalanaceae*), II Simpósio Nacional de Farmacologia e Química de Produtos Naturais, Fortaleza, 1983.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001.

LAUPLAND, K.B. et al. Invasive *Candida* species infections: a 5 year population-based assessment. **J Antimicrob Chemother**, v.46, n.3, p.532-7, Sept. 2005.

LEITE, J. et al. Biodiversity of rhizobia associated with cowpea cultivars in soil of the lower half of the São Francisco River Valley. **R Bras Ci. Solo**, 33:1215-1226, 2009.

LEUNG, A.Y. et al. *Candida tropicalis* fungemia in adult patients with haematological malignancies: clinical features and risk factors. **J Hosp Infect**, v.50, n. 4, p. 316-319, 2002.

LOGUERCIO, C. et al. Beneficial effects of a probiotic on parameters of liver dysfunction in chronic liver diseases. **J Clin Gastroenterol**, 39(6): 540-3, 2005.

MACIEL, M.A.M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n.3, p.429-38, 2002.

MANO, M.S. et al. Remaining controversies in the first line management of advanced ovarian cancer. **Int J Gynecol Cancer**, Sep-Oct, 14(5): 707-20, 2004.

MANOHAR, V. et al. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. **Molecular and cellular Biochemistry**, v. 228, n.1/2, p.111-117, 2001.

MARTINS, A.G. et al. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais, alimentares e tóxicas da Ilha de Combú, Município de Belém, Estado do Pará, Brasil. **Rev Bras Farm**, 86(1): 21-30, 2005.

MASCHMEYER, G.; HAAS, A. The epidemiology and treatment of infections in cancer patients. **Int J Antimicrob Agents**, 31: 193-197, 2008.

MATOS, B.M. et al. Atividade antifúngica do extrato alcoólico de *Mentha piperita* sobre *Candida albicans* e *C. tropicalis*. **Rev Odontol UNESP**, Araquara, v.38, n.4, p.244-48, jul./ago., 2009.

MATOS, F.J.A. **Plantas da medicina popular do nordeste**. UFC edições, 1999.

McGINNIS R.; RINALDI, M.G. Antifungal drugs: mechanisms of action, drug resistance, susceptibility testing, and assays of activity in biologic fluids. In: LORIAN, V. **Antibiotics in Laboratory Medicine**, Baltimore: Williams & Wilkins, p. 176-211, 1996.

MCLNTYRE, G. Oral Candidosis. **Dental Update**, 28: 132-9, 2001.

MEDRANO, D.J.A.; BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A. Candidemia em um hospital brasileiro: a importância da *Candida parapsilosis*. **Rev Inst Med Trop**, São Paulo, 48(1): 17-20, 2006.

MELLADO, E.; CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J.L. Importância clínica de los mecanismos de resistência de los hongos filamentosos a los antifúngicos. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, 20(10): 523-530, 2002.

MELLO, J.C.P.; PETROVICK, P.R. Quality control of *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae) hydroalcoholic extracts. **Acta Farm Bonaerense**, 19: 211-215, 2000.

MELO, N.R. et al. *Candida*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 99: 425-43, 2004.

MENDEZ, J.; BILIA, A.R.; MORELLI, I. Phytochemical investigations of *Licania* genus. Flavonoids and triterpenoids from *Licania pittieri*. **Pharma Acta Helv**, 223-226, 1995.

MENEZES, E.A. et al. Frequência e atividade enzimática de *Candida albicans* isolada da cavidade oral de pacientes HIV positivos em Fortaleza, Ceará. **Jornal Brasileiro de Patologia Medicina laboratorial**, v. 42, n. 4, p. 253-256, jul. / ago. 2006.

MERZ, W.G. *Candida lusitanae*: frequency of recovery, colonization, infection and amphotericin B resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, 20: 1194-1195, 1984.

MESA ARANGO, A.C.; BUENO SANCHEZ, J.G.; BETANCUR GALVIS, L.A. Productos naturales con actividad antimicótica. **Revista Espanhola de Quimioterapia**, Barcelona, v. 17, n. 4, p. 325-331, dec. 2004.

MINCOFF, P.C. et al. Isolation and characterization of a 30kD antifungal protein from seeds of *Sorghum bicolor*. **Research in Microbiology**, Amsterdam/New York. In Press, Available online 24 October 2005.

MOISMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods** 65: 55 – 63, 1983.

MORAIS, S.M.; BRAZ-FILHO, R. **Produtos naturais: estudos químicos e biológicos**. Fortaleza: EdUECE, 2007.

MORGAN, J. et al. Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a case-control study using data from population-based candidemia surveillance. **Infect Control Hosp Epidemiol**, 6: 540-547, 2005.

NAGLIK, J. et al. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. **Cell Microbiol**, 6(10): 915-926, 2004.

NAKAMURA, C.V. et al. *In vitro* activity of essential oil from *Ocimum gratissimum*, L. against four *Candida* species. **Research in Microbiology**, Amsterdam/New York, v. 155, p. 579-586, 2004.

NAVARRO, V. et al. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, v.53, p.143-7, 1996. In: WERKMAN, C; GRANATO, D. C.; KERBAUY, W.D.; SAMPAIO, F.C.; BRANDÃO, A.A.H.; RODE, S.M. Aplicações terapêuticas da *Punica granatum* L. (romã). *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, v.10, n.3, p.104-111, 2008.

NCCLS - NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Norma M27A2. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved standard M27A2**. National Committee Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA; USA: vol. 27, 9, 2002.

NIERO, R. et al A new anti-oedematogenic nor-pregnane derivative isolated from *Mandevilla illustris*. **Planta Med**; 68(9): 850-3, 2002.

NUCCI, M.; COLOMBO, A.L. Os fatores de risco de candidemia. Europa. **J Clin Microbiol Infect Dis**, 21: 209-11, 2002.

ODDS, F.C.; BROWN, A.J.; GOW, N.A. Antifungal agents: Mechanism of action. **TRENDS in microbiology**, Cambridge, v. 11, p. 272-279, 2003.

OLIVEIRA, E.M. et al. **Espécies do gênero *Candida* causadoras de infecções invasivas em pacientes com AIDS atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas**. Trabalho apresentado em congresso (não publicado) FMTAM – Amazonas, Brasil. 2006.

OLIVEIRA, F. et al. *Farmacognosia*. São Paulo: Atheneu, 1991.

ORLANDO, S.C. **Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto da casca do *Strphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Barbatimão)**. 89p. 2005. Dissertação (Mestrado em Promoção de Saúde) - Universidade de Franca, 2005.

OSTROSKY, E. et al., Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória de plantas medicinais. **Brasilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n.2, p.301-302, Abr-jun, 2008.

PEREIRA, A.P.V. Identificação Molecular de Candidoses invasivas no Centro Hospitalar Cova da Beira, E.P.E. 2010. 146p. Tese (Mestre em Ciências Biomédicas) - Universidade Nova de Lisboa, 2010.

PFALLER, M.A., DIEKEMA, D.J. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. **Rev Clin Microbiol**, January; 20(1): 133-163, 2007.

PICKERING, L. American Academy of Pediatrics: Antifungal drugs for systemic fungal infections. **Red Book**, Elk Grove, 2000.

POZZATTI, P. **Susceptibilidade de *Candida* spp sensíveis e resistentes ao fluconazol frente a óleos essenciais extraídos de condimentos**. 2007. 93p. F. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2007.

PRANCE, G.T. The taxonomy and phytogeography of the *Chrysobalanaceae* of the Atlantic coastal forest of Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 2, n. 5/6, p. 19-39, 1979.

PRESTA, G.A.; PEREIRA, N.A. Activity of abejeru (*Chrysobalanus icaco* Lin *Chrysobalanaceae*) in experimental study of hypoglycemic plants. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, n. 68 p.91-101, out-dez, 1987.

PRESTA, G.A. **Interferência do chá de abagerú (*Chrysobalanus icaco* Lin.) na glicemia de jejum de camundongos e indivíduos com diabetes mellitus - tipo II**. Rio de Janeiro, 58p. 1986. Dissertação de Mestrado, Faculdade Nacional de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1986.

QUADROS, A.U. et al. Antifungal activity of some cyclooxygenase inhibitors on *Candida albicans*: PGE2-dependent mechanism. **Folia Microbiol**, 56:349–352, 2011.

REIS, M.O.R. **Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro do extrato hidroalcoólico de folhas da *Persea gratissima* Gaertn - Abacateiro (*Lauraceae*)**. 2006, 76p. Dissertação (Mestrado em Promoção de Saúde) - Universidade de Franca, 2006.

REX, J.H. et al. Practice guidelines for the treatment of candidiasis Infections. Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, v.30, p.662-678, 2000.

RINDGEN, O. et al. Efficacy of amphotericin Bencapsulated in liposomes (AmBisome) in the treatment of invasive fungal infections in immunocompromised patients. **Journal Antimicrobial and Chemotherapy**, Oxford, v. 28, suppl B, p. 73-82, 1991.

RODRIGUEZ, C., PATRICK, C. New Therapeutic Options for Invasive Fungal Diseases. **Seminars Pediatr Infect Dis**, 12: 301 – 308, 2001.

SABLE, C.A.; STROHMAIER, K.M.; CHODAKEWITZ, J.A.; Advances in antifungal therapy. **Ann Rev Med**, v.59, p.361-79, 2008.

SAN MIGUEL, L.G. et al. Secular trends of candidemia in a large tertiary-care hospital from 1988 to 2000: emergence of *Candida parapsilosis*. **Infect Control Hosp Epidemiol**, 26(6): 548-552, 2005.

SANDUJA, R. et al. Isolation and Crystal structure of 5-hydroxy-8-dimethoxybezpyran-4-one from *Couepia paraensis*. **Phytochemistry**, v.2, n.6, p.1451-1453, 1982.

SANDUJA, R.; ALAM, M.; EULER, K.L. Constituents of *Couepia paraenses*. **Journal of Natural Products**, v.46, n.1, p.149, 1983.

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

SANT'ANA, P.L. et al. Multicenter Brazilian study of oral *Candida* species isolated from Aids patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 97: 253-7, 2002.

SANTOS, E.B. et al. Perfil da saúde bucal e presença de *Candida* na cavidade bucal de pacientes atendidos nas clínicas odontológicas da UEPG. **Publication UEPG. Ciências Biológicas e da Saúde**. V.8, n.1, p. 57-73, 2002.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.275-280, 2004.

SCHALLER, M. et al. *Candida albicans* secreted aspartic proteinases modify the epithelial cytokine response in an in vitro model of vaginal candidiasis. **Infect Immun**, v. 73, n. 5, p. 2758-65, 2005.

SHARAPIN, N. **Fundamentos da Tecnologia de Fitoterápicos**. Bogotá: Cytod, 2000.

SIDRIM, J.J. et al. Multirresistência a antimicrobianos mediada por plasmídios R em cepas de *Shigella flexneri* isoladas no nordeste do Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**; 31(3): 263-70, 1998.

SILVA JÚNIOR, J.O.C. **Obtenção e avaliação de forma farmacêutica semi-sólida fitoterápica contendo extrato seco por nebulização de *Simphytum officinale* L. (confrei)**. São Paulo, Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos, Universidade de São Paulo, 2006.

SILVA, D. et al. Incidência das micoses na Amazônia. **An Bras Dermatol**, 56: 187-196,1981.

SILVA, L. O tratamento das micoses oportunistas: quanto tempo é tempo suficiente? **Lancet Infect Dis**, 3(11): 703-708, 2003.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, 2007. 833p.

SMÂNIA, E.F.; **Estudo químico e de atividade antimicrobiana de espécies de *Ganoderma Karsten***, 2003, 193f. Tese (Doutorado em Química Orgânica), Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

SOARES, D.G.S. et al. Susceptibilidade *in vitro* de bactérias bucais a tinturas fitoterápicas. **Rev Odonto Ciênc**, 21(53): 232-237, 2006.

SOBEL, J.D. Limitations of antifungal agents in the treatment of *Candida* vaginitis: future challenges. **Drug Resistance Updates**, Edinburgh, v. 2, p.148-152, 1999.

SONAGLIO, D. et al. Desenvolvimento tecnológico e produção e fitoterápicos. In: Simões, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2003.

STONE, E.A.; FUNG, H.B.; IRSCHENBAUM, H.L. Caspofungin: Anechinocandin antifungal agent. **Clinical Therapeutics**, Princeton, v. 24, n.3, p. 351-377 (27), 2002.

SUNDQVIST, G. et al. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, 85: 86-93, 1998.

TAMPIERI, M.P. et al. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. **Mycopathologia**, v.159, n.3, p.339-345, 2005.

TANGA, M.B. et al. Diabetes inicial e candidíase bucal. **Odont Clin Cient**, v.2, n.1, p.21-29, jan./ abr.. 2003.

TRABULSI, L.R. et al. **Microbiologia**. 3 ed.São Paulo: Atheneu,1999.

VALLE, G.C.; RENDE, J.C.; OKURA, M. H. Estudo da incidência do gênero *Candida* em Hospital Público Universitário. **News Lab**, ed.101, p. 202-222, 2010.

VARGAS, S.G.F. et al. **Frutales tropicales de Tabasco**. 2ª ed. Villa hermosa: Centro de Investigación de Ciencias Biológicas, 2000.

VARGAS, S.G.F. **Icaco (*Chrysobalanus icaco* L.): análisis químico de flavonoides y propagación por estacas**. 1998. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo Edo.de México, 1998.

VAZQUEZ, J. A. et al. *In vitro* susceptibilities of *Candida* and *Aspergillus* species to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.17, n.2, p.60-63, 2000.

VEIGA JÚNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VENKATESAN, P.; PERFECT, J.R.; MYERS, S. Evaluation and management of Fungal infections Immunocompromised patients. **Dermatol Ther**, 18: 44-57, 2005.

VERMITSKY, J.P. et al. Pdr1 regulates multidrug resistance in *Candida glabrata*: gene disruption and genome-wide expression studies. **Mol Microbiol**, v.61, p. 704-722, 2006.

VIANI, P.R.C.; PAULA, C.R. **Candidas provenientes de infecção hospitalar isoladas de pacientes internados em hospital infantil do estado de São Paulo e avaliadas por marcadores fenotípicos** – dissertação de mestrado – publicada em 13/02/2008 no site da USP: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42132/tde-31012008-113443/>.

VIGO, C.L.S. et al. Caracterização farmacognóstica comparativa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Hebanthe paniculata* Martius - *Amaranthaceae* Kuntze. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.6, n.2, p.7-19, 2004.

WEBSTER, J.; WEBER, R. **Introduction to Fungi**. 3rd Edditon. Cambridge, 2007.

YAGIELA, N. **Farmacologia e Terapêutica para Dentistas**. 3ª edição. São Paulo. p. 447 – 498, 1999.

YANG, R. X. et al. 16S rDNA RFLP analysis of endophytic bacteria from *Brassica napus*. **Wei Sheng Wu Xue Bao**, Beijing, v. 45, n. 4, p. 606-609, 2005.

ZACCHINO, A. S. et al. The need for new antifungal drugs: screening for antifungal compounds with a selective mode of action with emphasis on the inhibitors of the fungal cell wall. In: RAI, M.; MARES, D. **Plant-derived antimycotis: current trends and future prospects**. Oxfordshire: Haworth Press, p. 1-41, 2003.

ZANARDI, D. et al. Avaliação dos métodos diagnósticos para onicomicose. **An Bras Derm**, v.83, n. 2, p. 119-24, 2008.

ZUQUE, A.L.F. et al. Avaliação das atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica de *Couepia glandiflora* Benth. (*Chrysobalanaceae*). **Rev Bras Farmacogn**, v.14, n.2, jul-dez, p.129-136, 2004.

# ANEXOS

**ANEXO A**  
**APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO ICS DA UFPA**



Universidade Federal do Pará

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS



Carta Provisória: 089/11 CEP-ICS/UFPA

Belém, 17 de junho de 2011.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcieni Ataíde de Andrade

Senhora Pesquisadora,

Temos a satisfação de informar que seu projeto de pesquisa "ATIVIDADE ANTICANDÍDICA IN VITRO DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE PLANTAS MEDICINAIS DA AMAZÔNIA FRENTE A ISOLADOS" CAAE 0051.0.073.000-11 e parecer nº060/11 CEP-ICS/UFPA, foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humano CEP-ICS/UFPA, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará na reunião do dia 04 de maio de 2011.

Assim, Vossa Senhoria tem o compromisso de entregar a este CEP, no dia 27 outubro de 2011, um relatório indicando qualquer alteração que possa ocorrer após a aprovação do protocolo.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Wallace Raimundo Araújo dos Santos.  
Coordenador do CEP-ICS/UFPA

**ANEXO B**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

**Título: Caracterização Farmacognóstica e Avaliação Antifúngica do Extrato Hidroalcoólico de *Chrysobalanus Icaco* Lin em espécies de *Candida*.**

Pesquisadoras:

Ana Regina Maués Noronha Peres

Marcieni Ataíde de Andrade

Marta Chagas Monteiro

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFPA

### **Introdução**

Você receberá informações sobre a presente pesquisa para que possa decidir em participar ou não da mesma, por isso leia atentamente e não deixe de esclarecer qualquer dúvida aos pesquisadores responsáveis pelo estudo.

### **Propósito**

Ao decidir pela participação neste estudo, você estará contribuindo na coleta de uma pequena amostra de sua saliva para que sejam realizados experimentos que avaliem a atividade de algumas plantas medicinais, o que pode favorecer o desenvolvimento de novos medicamentos no combate a alguns fungos, como a *Candida*.

## **ANEXO B**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

#### **Descrição**

Serão incluídos no presente estudo indivíduos que possuam de 18 a 59 anos, ambos os sexos, não sejam usuários de próteses bucais (dentaduras), nem tenham utilizado terapia prolongada com antibióticos e/ou imunossuppressores, por isso é importante que os participantes informem todos os medicamentos dos quais faz uso. Os indivíduos participantes também serão submetidos ao exame clínico intrabucal, realizado por uma cirurgiã-dentista, para assegurar que os mesmos não possuam diagnóstico clínico de candidíase oral.

#### **Custo e pagamento**

Não haverá nenhum custo adicional para o voluntário, nem pagamento pela sua participação. Todo o material necessário para o desenvolvimento desta pesquisa será de responsabilidade dos pesquisadores.

#### **Sigilo**

Ao indivíduo participante deste estudo é garantida a manutenção de sigilo sobre os seus dados cadastrais e sua identidade no ato de publicação verbal ou escrita deste trabalho, assegurada pelos pesquisadores responsáveis pela execução do mesmo.

#### **Direito de se retirar da pesquisa**

O voluntário pode recusar-se ou desistir de participar em qualquer momento, desde que antes da publicação dos resultados da pesquisa, não sendo passível de nenhuma punição e/ou prejuízo.

## **ANEXO B**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

#### **Desconforto, riscos e benefícios**

As amostras de saliva serão coletadas através de *swabs* orais que não causarão nenhum desconforto ou risco para o participante. Em se tratando de benefícios, a sua participação pode colaborar na compreensão da atividade de algumas plantas medicinais frente a infecções bucais causadas por fungos que afetam grande parte da população mundial.

#### **Linguagem acessível e esclarecimentos**

Todo participante deverá estar em condições de autonomia plena e boa saúde geral. Os esclarecimentos e informações fornecidos ao voluntário sobre a forma como o trabalho será realizado e seus objetivos serão feitos em uma linguagem clara e acessível.

#### **Consentimento voluntário**

O voluntário deve certificar-se de que leu e entendeu o exposto acima, bem como esclareceu todas as suas dúvidas. Uma cópia do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) ficará sobre a sua responsabilidade e a outra será arquivada junto aos documentos da pesquisa. A assinatura deste termo significa concordância em participar voluntariamente como doador de pequena amostra de material biológico (saliva) para realização desta pesquisa.

#### **Contato: Instituto de Ciências da Saúde**

**Faculdade de Farmácia da UFPA**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

**Telefone:(91) 3201-7754. Entrar em contato com Dr<sup>a</sup> Marcieni Ataíde de Andrade.**

**ANEXO B**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

Eu, \_\_\_\_\_  
nascido (a) em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_, na cidade de  
\_\_\_\_\_, portador (a) de RG  
\_\_\_\_\_ e CPF \_\_\_\_\_  
residente em \_\_\_\_\_, nº  
\_\_\_\_\_, estado civil \_\_\_\_\_ desejo participar da pesquisa  
**“Caracterização Farmacognóstica e Avaliação Antifúngica do Extrato  
Hidroalcoólico de *Chrysobalanus Icaco* Lin em espécies de *Candida*”** e tenho  
amplo conhecimento que o presente estudo tem como objetivo favorecer a  
pesquisa, o diagnóstico e o tratamento. Concordo que fotografias intrabucais, assim  
como material biológico (saliva) constituem propriedade da Faculdade de Farmácia  
da Universidade Federal do Pará/UFPA, a qual dou plenos direitos de retenção e  
uso para quaisquer fins de ensino, pesquisa, divulgação em jornais e/ou revistas  
científicas. Declaro também ter lido e entendido a carta de informação e consinto a  
minha participação no estudo.

\_\_\_\_\_  
Assinatura - Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

**ANEXO C**  
**FICHA DE ANAMNESE ODONTOLÓGICA**

**Dados Pessoais**

Nome: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_/\_\_/\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

**História Médica**

Diabetes: ( ) Sim ( ) Não

Hipertensão: ( ) Sim ( ) Não

Asma: ( ) Sim ( ) Não

Soropositivo para HIV: ( ) Sim ( ) Não

Lúpus: ( ) Sim ( ) Não

Fez cirurgia: \_\_\_\_\_ Tipo: \_\_\_\_\_ Tempo: \_\_\_\_\_

É usuário de drogas? ( ) Sim ( ) Não

Toma algum medicamento: \_\_\_\_\_ Qual?: \_\_\_\_\_ Tempo: \_\_\_\_\_

Fez uso recente de algum medicamento: \_\_\_\_\_ Qual?: \_\_\_\_\_ Tempo: \_\_\_\_\_

Toma chá constantemente: \_\_\_\_\_ Qual(is)?: \_\_\_\_\_

**História Odontológica**

Faz tratamento odontológico com frequência: \_\_\_\_\_ Qual?: \_\_\_\_\_

Condição dos tecidos moles bucais:

Lesões em mucosa jugal? \_\_\_\_\_ Tipo: \_\_\_\_\_

Lesões em palato mole? \_\_\_\_\_ Tipo: \_\_\_\_\_

Lesões em palato duro? \_\_\_\_\_ Tipo: \_\_\_\_\_

Lesões em assoalho de língua? \_\_\_\_\_ Tipo: \_\_\_\_\_

**ANEXO C**  
**FICHA DE ANAMNESE ODONTOLÓGICA**

Lesões na língua? Tipo:

Lesões na úvula? Tipo:

Condição dos tecidos duros bucais:

- Desdentado total
- Desdentado total com prótese
- Desdentado parcial
- Desdentado parcial com prótese
- Implantes dentários
- Aparelho ortodôntico fixo
- Aparelho ortodôntico removível
- Sangramento Gengival
- Perda de inserção clínica

Total de dentes com perda de inserção clínica:

Total de dentes ausentes:

**ANEXO D**  
**LAUDO DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA**

**Em pa**

**Amazônia Oriental**  
**LABORATÓRIO DE BOTÂNICA-HERBÁRIO**

**LAUDO DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA**

1) Dados do Solicitante

Pessoa Física ou Jurídica: Anivaldo Peres (UFPa)			
CPF ou CNPJ:		C.I. ou Inscrição Estadual	
Endereço:			
Bairro:	CEP:	Cidade: Belém	UF: PA
Telefone: 91092726	FAX:	E-mail:	

2) Dados do Material para Análise – Nº do NID: 40/2011 (controle do Laboratório)

Local de Origem: Salinópolis-PA		Quantidade de Amostras: 01	
Tipo de Amostra: (X) Fértil ( ) Estéril			
Nome do Coletor: Anivaldo Peres			
Data de Entrada no Laboratório: 23.05.2011		Analisado por: Miguel Pastana	
Destino e/ou Utilização do Laudo: Mestrado		Supervisionado por: Silvane Tavares	

3) Processo utilizado para Identificação:

Comparação com exsiccatas do acervo do herbário IAN.  
Classificação dos gêneros em família segundo APG III.

**RESULTADO DAS ANÁLISES**

Cod.	Nome Comum	Nome Científico	Família
01	Agirú.abageru.crajirú	<i>Chrysobalanus icaco</i> L.	<i>Chrysobalanaceae</i>

**Obs:** Prazo de permanência do material no laboratório: 60 dias; a partir dessa data, o material ficará a critério do laboratório.

Laudo digitado em: 23.08.2011

Supervisionado em: 29/08/2011

Por: Orlando

*Silvane T. Rodrigues*

**Silvane Tavares Rodrigues**  
Pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental

Ministério da  
Agricultura e do  
Abastecimento

Empresa Brasileira de  
Pesquisa Agropecuária

Trav. Dr. Enéas Pinheiro, s/n  
Bairro do Marco  
CEP: 66.095-100 – Belém-Pa

Telefax (091) 3276-8945  
Fone: 32041143/32041141  
regina@cpatu.embrapa.br