

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Potencial anti-*Candida albicans* dos extratos etanólico e aquoso das folhas
de *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud.**

STÉFANI DE OLIVEIRA ROSA

Dourados - MS

2024

STÉFANI DE OLIVEIRA ROSA

Potencial anti-*Candida albicans* dos extratos etanólico e aquoso das folhas de *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud.

Área do CNPq: Microbiologia Aplicada (2.12.02.00-1).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Doenças Crônicas e Infecto-Parasitárias

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Kelly Mari Pires de Oliveira

Dourados - MS

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

R789p Rosa, Stéfani De Oliveira

Potencial anti-Candida albicans dos extratos etanólico e aquoso das folhas de Bauhinia holophylla (Bong.) Steud. [recurso eletrônico] / Stéfani De Oliveira Rosa. -- 2024.
Arquivo em formato pdf.

Orientador: Kelly Mari Pires de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2024.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Candida albicans. 2. Patógeno oral. 3. Atividade antifúngica. 4. Bauhinia holophylla Bong. (Steud.). 5. Plantas medicinais. I. Oliveira, Kelly Mari Pires De. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR STÉFANI DE OLIVEIRA ROSA, ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "DOENÇAS CRÔNICAS E INFECTO-PARASITÁRIAS".

Aos sete dias do mês de março do ano de dois mil e vinte e quatro, às quatorze horas, em sessão pública, realizou-se na Universidade Federal da Grande Dourados, a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada "**Potencial anti-*Candida albicans* dos extratos etanólico e aquoso das folhas de *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud.**", apresentada pela mestranda Stéfani de Oliveira Rosa, do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos membros: Prof.^a Dr.^a Kelly Mari Pires de Oliveira/UFGD (presidente/orientadora), Prof.^a Dr.^a Cláudia Andréa Lima Cardoso/UEMS (membro titular externo), Prof.^a Dr.^a Adriana Araujo de Almeida Apolonio/UEMS (membro titular externo). Iniciados os trabalhos, a presidência deu a conhecer à candidata e aos integrantes da banca as normas a serem observadas na apresentação da Dissertação. Após a candidata ter apresentado a sua Dissertação, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições. Terminada a Defesa, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo sido a candidata considerada APROVADA. A Presidente da Banca atesta a participação dos membros que estiveram presentes de forma remota, conforme declarações anexas. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Dourados/MS, 07 de março de 2024.

Documento assinado digitalmente
gov.br KELLY MARI PIRES DE OLIVEIRA
Data: 11/03/2024 10:22:27-0306
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Kelly Mari Pires de Oliveira
Presidente/orientadora
(Participação Remota)

Documento assinado digitalmente
gov.br CLAUDIA ANDREA LIMA CARDOSO
Data: 08/03/2024 11:44:29-0306
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Cláudia Andréa Lima Cardoso
Membro Titular Externo
(Participação Remota)

Documento assinado digitalmente
gov.br ADRIANA ARAUJO DE ALMEIDA APOLONIO
Data: 07/03/2024 16:48:53-0306
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Adriana Araujo de Almeida
Apolonio
Membro Titular Externo
(Participação Remota)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida e Nossa Senhora de Aparecida por sua interseção e amor infinito em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Silene e Clodoaldo, por todo amor, dedicação e incentivo para que eu realize meus sonhos. A minha irmã Joice pelo companheirismo e amor. Eu amo vocês incondicionalmente.

Aos meus amigos Juliana, Karoline, Natieli, Tanielen e Jailton por sempre acreditarem em mim, pelo apoio e amizade. Obrigada por todos os momentos que vivemos juntos.

Aos meus amigos e parceiros de laboratório, João Vítor e Cleison, por toda ajuda, amizade e companheirismo. Vocês são muito especiais e foram essenciais nessa jornada. Saibam que sempre estarei torcendo pelo sucesso e felicidade de vocês. Muito obrigada, meus amigos!

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Kelly Mari Pires de Oliveira, pela oportunidade, ensinamentos pessoais e profissionais e orientação.

A Fabiana, que admiro imensamente pela profissional, pelo ser humano incrível que é e por tamanha generosidade comigo. A Adriana por toda ajuda desde a concepção deste projeto, ensinamentos, apoio e carinho durante o desenvolvimento desse trabalho. A Renata por todo carinho e ajuda.

A Pamella e a Fernanda por todos os ensinamentos e momentos vividos durante esses anos de laboratório. A Diana por toda ajuda e companheirismo que desenvolvemos nessa reta final de trabalho. E a toda equipe GEnMicro: Mariane, Lívia, Guilherme e José Eduardo por toda ajuda durante a realização dos experimentos. Vocês foram essenciais para a execução desse trabalho. Obrigada por tudo!

A Prof^a. Dr^a. Andréia Sangalli por sua disponibilidade para realizar as coletas e conhecimento transmitido com tanto carinho.

A Prof^a. Dr^a. Cláudia Cardoso pela realização dos ensaios de caracterização fitoquímica da planta avaliada e composição da banca avaliadora de qualificação e defesa.

E a todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho e construção do meu conhecimento.

Muito obrigada!

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Infecção da mucosa oral por <i>C. albicans</i> . Fonte: A autora (2023)	14
Figura 2. Folhas de <i>Bauhinia holophylla</i> (Bong.) Steud. Fonte: A autora (2023)	18
Figura 3. Flores de <i>Bauhinia holophylla</i> (Bong.) Steud. Fonte: Carvalho (2023)	18

ARTIGO

Figura 1. Gráfico de absorbância na região UV/Vis dos extratos etanólico e aquoso das folhas de <i>Bauhinia holophylla</i> (Bong.) Steud. Absorbância (unidade de absorbância), comprimento de onda (nanômetro).....	34
Figura 2. UHPLC – DAD dos extratos aquoso e etanólico das folhas de <i>Bauhinia holophylla</i> (Bong.) Steud. (1) Ácido protocatecuico; (2) Epicatequina; 3) Rutina; A) extrato etanólico; B) extrato aquoso.....	39
Figura 3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da morfologia e organização celular de <i>C. albicans</i> tratada e não tratada com EEB e EAB. A) CIM do extrato aquoso; B) 2xCIM do extrato aquoso; C) CIM do extrato etanólico; D) 2xCIM do extrato etanólico; E) Não tratado.....	41
Figura 4. Cinética de crescimento de <i>Candida albicans</i> ATCC 90028 tratada e não tratada com EEB (2XCIM), EAB (2XCIM) e fluconazol.....	44
Figura 5. Atividade de EEB e EAB na formação (A) e destruição de biofilmes pré-formados (B).....	44
Figura 6. Efeito dos extratos etanólico e aquoso das folhas de <i>Bauhinia holophylla</i> (Bong.) Steud. e fluconazol na formação de tubos germinativos por <i>C. albicans</i> após 3h de tratamento.....	45
Figura 7. Atividade hemolítica dos extratos etanólico e aquoso das folhas de <i>Bauhinia holophylla</i> (Bong.) Steud.....	46

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Trabalhos que descrevem o potencial biológico de <i>Bauhinia holophylla</i> (Bong.) Steud.....	19
---	----

ARTIGO

Tabela 1. Quantificação dos compostos dos extratos etanólico e aquoso das folhas de <i>B. holophylla</i> (Bong.) Steud.....	39
Tabela 2. Teor (mg/g) dos compostos identificados por UHPLC-DAD dos extratos das folhas de <i>Bauhinia holophylla</i> (Bong.) Steud.....	40
Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima em µg/mL dos extratos etanólico e aquoso das folhas de <i>Bauhinia holophylla</i> (Bong.) Steud, gluconato de clorexidina e nistatina frente <i>C. albicans</i> ATCC 90028, ATCC 10231 e isolados da mucosa oral de pacientes com HIV/AIDS.....	40
Tabela 4. Efeito dos extratos etanólico e aquoso das folhas de <i>B. holophylla</i> (Bong.) Steud na presença e ausência sorbitol.....	42
Tabela 5. Efeito dos extratos etanólico e aquoso das folhas de <i>B. holophylla</i> (Bong.) Steud na presença e ausência de ergosterol exógeno.....	42
Tabela 6. Atividade antifúngica dos extratos etanólico e aquoso das folhas de <i>Bauhinia holophylla</i> (Bong.) Steud. sozinhos e em combinação com gluconato de Clorexidina, nistatina e fluconazol frente <i>C. albicans</i> ATCC 90028.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ANOVA – *Analysis of variance*

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância sanitária

ATCC – *American Type Culture Collection*

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CO – Candidíase oral

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DAD – Detector de arranjo de diodos

DMSO – Dimetilsulfóxido

EEB – Extrato etanólico das folhas de *Baunihia holophylla* (Bong.) Steud.

EAB – Extrato aquoso das folhas de *Baunihia holophylla* (Bong.) Steud.

et al. – e outros

FAIND – Faculdade Intercultural indígena

FTG – Formação de tubo germinativo

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

PBS - *Phosphate buffered saline*

PGR – Porcentagem de redução de germinação

Rpm - Rotações por minuto

SisGen - Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

UFGD – Universidade Federal da Grande Dourados

UHPLC – Cromatógrafo líquido de ultra eficiência

UV-vis – Região do Ultravioleta e Visível

g – grama

h – hora

nm – nanômetro

mg – miligrama

mL – mililitro

p/v – volume

v/v – volume

YNB – Yeast Peptone Dextrose

YNB – Yeast Nitrogen Base

µg – micrograma

µL – microlitro

°C – Graus Celsius

n° – Número

% – Porcentagem

Potencial anti-*Candida albicans* dos extratos etanólico e aquoso de *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud.

RESUMO

A candidíase oral é uma infecção fúngica causada principalmente por *Candida albicans*, considerada um problema de saúde pública que afeta grande parte da população. *Candida albicans* habita comensalmente a microbiota normal humana, entretanto, o desequilíbrio do organismo hospedeiro pode causar a transição do estágio comensal para patogênico. Aliado a isso, a terapia tópica desta infecção é restrita ao uso dos antifúngicos gluconato de clorexidina e nistatina, porém, estes apresentam efeitos citotóxicos e adversos associados. Diante da necessidade de suprir a limitada terapia antifúngica, as plantas medicinais configuram-se como uma rica possibilidade para o desenvolvimento de agentes antifúngicos capazes de atuar no tratamento de candidíase oral. *Bauhinia holophylla* Bong. Steud. conhecida como “pata-de-vaca” pertence à família Fabaceae e é popularmente utilizada para tratar infecções e processos inflamatórios, no entanto, seu potencial antifúngico ainda é pouco elucidado. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a composição química e atividade antifúngica dos extratos etanólico e aquoso de *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. frente *Candida albicans*. Os extratos foram submetidos a análise por varredura na região ultravioleta (UV/Vis), análise qualitativa de metabólitos secundários e Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência com detector de arranjo de diodos. A atividade antifúngica de EEB e EAB foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo, assim como, os mecanismos de ação via sorbitol e via ergosterol. O método de *Checkerboard* foi utilizado para determinar a combinação dos extratos com gluconato de clorexidina, nistatina e fluconazol. A cinética de crescimento foi realizada pelo método de contagem de células viáveis expressas em células/mL. A formação de tubos germinativos foi avaliada por contagem em câmara de Neubauer em microscópio óptico. A atividade antibiofilme foi determinada por contagem de células viáveis e método XTT. Por fim, a atividade hemolítica foi avaliada em eritrócitos humanos e quantificada em espectrofotômetro. Os resultados obtidos indicaram a presença de ácido protocatecuico, epicatequina e rutina nos dois extratos. EEB apresentou atividade antifúngica com CIM de 15,68 µg/mL e EAB 31,25 µg/mL frente *C. albicans* ATCC 90028, ATCC 10231 e frente aos seis isolados orais CIM entre 7,8 – 62,5 µg/mL. Os ensaios de mecanismos de ação sugerem que possivelmente EEB e EAB se ligam ao ergosterol presente na membrana celular fúngica. EEB apresentou efeito sinérgico com gluconato de clorexidina, nistatina e fluconazol e EAB com nistatina e fluconazol. No ensaio de cinética de crescimento, os tratamentos com EEB e fluconazol exibiram redução

semelhante. Os extratos não apresentaram atividade sobre a formação e destruição de biofilmes. Na formação de tubo germinativo por *C. albicans*, EEB e EAB apresentaram uma porcentagem de redução de germinação de 29% e 31%, respectivamente, e o fluconazol de 24%. Ambos os extratos não apresentaram percentual hemolítico em eritrócitos humanos. Os resultados encontrados indicam o potencial dos extratos de *B. holophylla* no controle da candidíase oral, destacando sua possível utilidade como alternativa terapêutica.

Palavras-chave: *Candida albicans*; Patógeno oral; Atividade antifúngica; *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud.; Plantas medicinais.

Anti-*Candida albicans* potential of ethanolic and aqueous extracts of *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud.

ABSTRACT

Oral candidiasis is a fungal infection caused mainly by *Candida albicans*, considered a public health problem that affects a large part of the population. *Candida albicans* inhabits the normal human microbiota commensally, however, an imbalance in the host organism can cause a transition from the commensal to the pathogenic stage. In addition, topical therapy for this infection is restricted to the use of the antifungals chlorhexidine gluconate and nystatin, but these have associated cytotoxic and adverse effects. Faced with the need to supply limited antifungal therapy, medicinal plants are a rich possibility for the development of antifungal agents capable of acting in the treatment of oral candidiasis. *Bauhinia holophylla* Bong. Steud. known as "pata-de-vaca" belongs to the Fabaceae family and is popularly used to treat infections and inflammatory processes, however, its antifungal potential is still poorly understood. The aim of this study was therefore to evaluate the chemical composition and antifungal activity of the ethanolic and aqueous extracts of *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. against *Candida albicans*. The extracts were subjected to scanning analysis in the ultraviolet region (UV/Vis), qualitative analysis of secondary metabolites and Ultra Efficiency Liquid Chromatography with a diode array detector. The antifungal activity of EEB and AEB was determined using the broth microdilution technique, as well as the mechanisms of action via sorbitol and ergosterol. The Checkerboard method was used to determine the combination of extracts with chlorhexidine gluconate, nystatin and fluconazole. Growth kinetics were performed using the viable cell counting method expressed in cells/mL. The formation of germ tubes was evaluated by counting in a Neubauer chamber under an optical microscope. Antibiofilm activity was determined by viable cell counting and the XTT method. Finally, hemolytic activity was evaluated in human erythrocytes and quantified using a spectrophotometer. The results showed the presence of protocatechuic acid, epicatechin and rutin in both extracts. EEB showed antifungal activity with MIC of 15.68 µg/mL and AEB 31.25 µg/mL against *C. albicans* ATCC 90028, ATCC 10231 and against the six oral isolates with MIC between 7.8 – 62.5 µg/mL. The sorbitol and exogenous ergosterol assays suggest that EEB and EAB possibly bind to the ergosterol present in the fungal cell membrane. EEB showed a synergistic effect with chlorhexidine gluconate, nystatin and fluconazole and AEB with nystatin and fluconazole. In the growth kinetics assay, treatments with EEB and fluconazole exhibited a similar reduction. The extracts did not show activity on the formation and

destruction of biofilms. In the formation of germ tube by *C. albicans*, EEB, AEB showed a percentage reduction in germination of 29% and 31%, respectively, and fluconazole of 24%. Both extracts did not show a hemolytic percentage in human erythrocytes. The results found showed promising activities of the extracts from the perspective of controlling *C. albicans*, especially with regard to oral candidiasis.

Keywords: *Candida albicans*; Oral pathogen; Antifungal activity; *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud.; Medicinal plants.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 <i>Candida albicans</i>	13
2.2 Candidíase oral	14
2.3 Novas alternativas para o tratamento de candidíase oral	16
2.4 <i>Bauhinia holophylla</i> (Bong.) Steud.	17
3 OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo geral	20
3.2 Objetivos específicos	20
4. REFERÊNCIAS	22
5. ANEXOS.....	27

1 INTRODUÇÃO

A incidência de candidíase oral tem aumentado nos últimos anos (BESSA et al., 2021) e se caracterizado como uma relevante fonte de morbidade em virtude das limitações e prejuízos causados à saúde e qualidade de vida dos indivíduos acometidos, como dor crônica, incômodo durante a mastigação e deglutição dos alimentos, principalmente em idosos e imunocomprometidos (PATIL et al., 2015). *Candida albicans* é o agente patogênico prevalente em casos de candidíase oral (HELLSTEIN; MAREK, 2019). Esta levedura habita comensalmente diversas mucosas do corpo humano, dentre elas a cavidade oral, no entanto, quando ocorre o desequilíbrio da flora oral normal ocasionados por fatores predisponentes, como HIV/AIDS (KARAJACOB et al., 2023), uso de prótese dentária, tabagismo, diabetes, tratamento oncológico (PATEL, 2022), uso de antibióticos (SHARMA, 2019), enxaguatórios bucais antimicrobianos e corticosteroides (PATIL et al., 2015) há uma ruptura da relação harmônica entre hospedeiro e *C. albicans*, o que leva ao desenvolvimento de candidíase oral (PATEL, 2022).

No cenário atual, os agentes antifúngicos bucais padrão-ouro utilizados para o tratamento tópico dessa infecção são a nistatina e o gluconato de clorexidina (SCHEIBLER et al., 2017), entretanto, apresentam efeitos colaterais (SANTOS et al., 2017; SWANT; KAN, 2017) e associação com toxicidade (GIANNELLI et al., 2008; COELHO et al., 2020; BABICH et al., 1995). Diante dessa limitação, a busca por novas alternativas terapêuticas é necessária para prevenir e tratar a candidíase oral (RODRIGUES et al., 2019) com substâncias de menor toxicidade e menos efeitos colaterais que os antifúngicos convencionais (CONTALDO et al., 2022). Nesse sentido, as plantas medicinais têm se mostrado uma promissora fonte de compostos bioativos naturais antifúngicos e se configuram como uma possibilidade acessível, barata e segura para tratamento de candidíase oral (GHARIBPOUR et al., 2021).

Desse modo, *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud., planta endêmica brasileira que pode ser encontrada nas regiões Centro-oeste, Sul, Sudeste e Norte do país (VAZ, 2015), figura-se como uma possibilidade a ser estudada para prevenção e tratamento da candidíase oral levando em consideração as suas aplicações medicinais, que estão associadas ao tratamento de infecções e processos inflamatórios (RIBEIRO et al., 2018; CECHINEL FILHO, 2009; SILVA; CECHINEL FILHO, 2002). O estudo de Fonseca et al. (2022) demonstra que *B. holophylla* possui potencial antifúngico, entretanto, informações sobre mecanismo de ação, combinação com antifúngicos e citotoxicidade são necessários.

Diante deste fato e da necessidade de novos compostos naturais que possam atuar na prevenção e tratamento da candidíase oral, o presente estudo tem como objetivos avaliar a composição química de *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud, a atividade antifúngica dos extratos etanólico e aquoso frente *C. albicans*, determinar os mecanismos de ação, avaliar a atividade sinérgica com antifúngicos convencionais, avaliar a cinética de crescimento de *C. albicans* na presença dos extratos, atividade antibiofilme, verificar a ação dos extratos sobre a formação de tubos germinativos e avaliar a citotoxicidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Candida albicans*

O gênero *Candida* é composto por 300 espécies representantes, pertencentes ao filo Ascomycota, classe Saccharomycetes, ordem Saccharomycetales e família Debaryomycetaceae (TAKASHIMA; SUGITA, 2022). Esses fungos são amplamente distribuídos na natureza e podem ser encontrados em diversos habitats, incluindo o corpo humano. Dentre as espécies patogênicas desse gênero, *C. albicans* é uma das mais relevantes e conhecidas (TALAPKO, et al. 2021).

O polimorfismo ou dimorfismo presente em *C. albicans* promove a transição de sua forma comensal para a patológica, ocasionando o processo de invasão tecidual (CIUREA et al., 2020). Consiste na capacidade de alternar da forma leveduriforme para pseudo-hifas e hifas verdadeiras. O processo de transição morfológica de *C. albicans* se inicia no decorrer do processo de divisão celular, que pode ocorrer por brotamento e promover a formação de uma nova célula de formato oval a partir da célula-mãe ou por filamentação em que uma protuberância denominada botão germinativo surge na célula (CORRÊA et al., 2020) e gera a formação de filamentos tubulares longos com lados paralelos e sem constrição no local da septação (KORNITZER, 2019; SUDBERY, 2011) que são denominados tubos germinativos e dão início a filamentação (CORRÊA et al., 2020; Gow, 2002). Essa variação morfológica ocorre sob influência de condições ambientais como pH alcalino, temperatura superior a 37 °C, presença de soro e CO₂ em alta concentrações (BASSO et al., 2019). *Candida albicans* é capaz de colonizar várias partes do corpo humano, dentre elas a cavidade oral (SHAO et al., 2022). Em condições normais, esta coexiste de forma equilibrada no organismo, sem causar problemas significativos (PATEL, 2022).

A presença de *C. albicans* na microbiota normal humana desempenha um papel essencial na manutenção da homeostase e na regulação do sistema imunológico. O fungo interage com as células imunes do hospedeiro, estimulando respostas imunológicas apropriadas e ajudando a proteger contra a colonização de patógenos externos. Essa interação simbiótica é benéfica para o hospedeiro, pois contribui para a diversidade e estabilidade da microbiota (SHAO et al. 2022). No entanto, esse fungo oportunista pode se tornar agente causador de infecções, especialmente em pacientes imunossuprimidos ou com fatores predisponentes como tabagismo, xerostomia, uso de antimicrobianos, entre outros (SHARMA, 2019).

Candida albicans possui uma capacidade única de se adaptar e sobreviver em diferentes ambientes, o que pode dificultar o tratamento das infecções. Além disso, a espécie tem mostrado resistência a alguns antifúngicos, particularmente à classe dos azólicos e das equinocandinas, o que representa um desafio no combate às infecções causadas por ela (PRISTOV; GHANNOUM, 2019).

2.2 Candidíase oral

No cenário das doenças fúngicas ocasionadas por leveduras do gênero *Candida* a candidíase oral é uma infecção oportunista caracterizada pelo crescimento fúngico excessivo e invasão tecidual superficial, principalmente na língua (figura 1) e em outras regiões da mucosa oral (HELLSTEIN; MAREK, 2019; MILLSOP; FASE, 2016; SINGH et al., 2014). *Candida albicans* é o principal agente patogênico, sendo responsável por 95% dos casos (VILA et al., 2020). Trata-se de condição comum e pode acometer pessoas de todas as idades, desde recém nascidos até idosos e ocorre igualmente em mulheres e homens (TAYLOR; BRIZUELA; RAJA, 2023). *Candida albicans* é um organismo comumente encontrado na flora microbiana normal (NAGLIK et al., 2011), onde se desenvolvem de forma comensal, entretanto, se torna patogênico sob condições predisponentes.

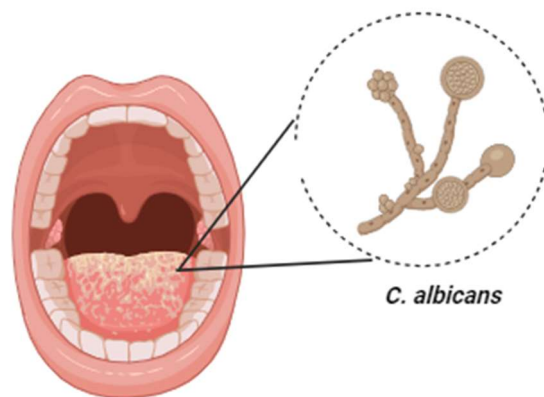


Figura 1. Infecção da mucosa oral por *C. albicans*. Fonte: A autora (2023).

Os principais fatores de risco são associados à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV – 1), diabetes, tratamento oncológico ou uso de medicamentos imunossupressores, nestes cenários, a capacidade do organismo de controlar o crescimento fúngico é reduzida, aumentando o risco de infecção (SHARMA, 2019).

É importante ressaltar que a candidíase oral não se limita apenas à diminuição da imunidade ou ao desequilíbrio da microbiota oral. Outros fatores, como tabagismo, próteses dentárias mal ajustadas, higiene oral inadequada e desnutrição, podem favorecer o crescimento excessivo da *C. albicans*. Esses fatores podem criar condições favoráveis para a colonização e multiplicação do fungo, resultando em infecção (BORGES, 2021). A interação entre a *C. albicans* e o sistema imunológico do hospedeiro também desempenha um papel importante no processo de infecção. A resposta imunológica, incluindo a ativação de células imunes e a liberação de citocinas, pode afetar a progressão e a gravidade da infecção (SHARMA, 2019).

A Candidíase oral é comumente caracterizada por formas mistas e multifocais, sendo frequentemente assintomática ou manifestando-se por meio de sintomas como sensação de queimação, dor e sabor desagradável. A sua duração é variável e pode estender-se ao longo de semanas ou até mesmo, anos (LU, 2021).

A candidíase oral pode se apresentar de variadas formas e com manifestações clínicas distintas. A candidíase pseudomembranosa se caracteriza pela presença de placas amarelo-esbranquiçadas na mucosa oral, que podem ser facilmente removidas por raspagem e deixam uma base erosiva vermelho subjacente (VILA et al., 2020; HELLSTEIN; MAREK, 2019; WILLIAMS et al., 2013; MILLSOP; FASE, 2016).

Outra variação é a candidíase eritematosa aguda, que se manifesta por uma vermelhidão difusa na mucosa oral, muitas vezes acompanhada por dor e desconforto, que afeta principalmente a parte dorsal da língua (VILA et al., 2020; WILLIAMS et al., 2013). A candidíase eritematosa crônica é comumente denominada estomatite protética, pois está associada ao uso de prótese dentária e manifesta-se como uma vermelhidão na mucosa palatina recoberta pela prótese (WILLIAMS et al., 2013).

A candidíase hiperplásica crônica é uma forma rara de Candidíase oral e é caracterizada por leucoplasias ou placas brancas elevadas na região comissural da boca ou no dorso da língua que não podem ser removidas com facilidade (VILA et al., 2020; WILLIAMS et al., 2013).

As diferentes manifestações clínicas podem apresentar desafios no tratamento devido a algumas características específicas da infecção. Embora existam opções de tratamento disponíveis, a eficácia do tratamento pode variar dependendo de vários fatores, incluindo a gravidade da infecção, a presença de fatores de risco subjacentes e a resistência aos antifúngicos (BORGES, 2021). O uso frequente e inadequado de antifúngicos pode levar ao desenvolvimento de resistência em *C. albicans*. Isso significa que a levedura se torna menos sensível aos efeitos dos antifúngicos, tornando o tratamento menos eficaz. A resistência aos antifúngicos pode ser intrínseca ou adquirida por diversos fatores (SHARMA, 2019).

A resistência fúngica adquirida pode variar e envolver diferentes mecanismos. Um dos principais mecanismos envolvidos é a expressão aumentada de genes relacionados à resistência aos antifúngicos. Esses genes podem codificar proteínas que alteram a estrutura ou a função do alvo do antifúngico, diminuindo sua eficácia (BELLMANN, 2017). Além disso, o uso prolongado de antifúngicos pode selecionar mutações genéticas nas cepas de *C. albicans*, conferindo-lhes uma vantagem seletiva na presença do antifúngico. Essas mutações podem afetar diversos aspectos da resposta fúngica aos antifúngicos, como a absorção, a metabolização ou a eliminação do fármaco (BELLMANN, 2017).

Desta forma, a candidíase oral pode ser recorrente em alguns indivíduos, mesmo após o tratamento adequado. Isso pode ocorrer devido à persistência de *C. albicans* no organismo ou à reinfecção por exposição contínua a fatores de risco. Em tais casos, é fundamental identificar e tratar a causa subjacente da recorrência, atentando-se para a melhoria da imunidade, o ajuste de próteses dentárias e higiene oral adequada (BORGES, 2021).

2.3 Novas alternativas para o tratamento de candidíase oral

As plantas se configuram uma fonte extremamente diversa de compostos bioativos, no entanto, apenas 6% da flora terrestre foi avaliada em relação às suas propriedades biológicas (CRAGG; NEWMAN, 2013). Além de seus metabólitos primários, as plantas sintetizam metabólitos secundários, uma rica variedade de moléculas com funções diversas que exibem propriedades notáveis, incluindo alta atividade antimicrobiana, grande disponibilidade, poucos efeitos colaterais e preço baixo, o que confere potencial para o desenvolvimento de novos antifúngicos (ZHOU et al., 2023).

O uso de extratos vegetais para o tratamento de infecções é uma prática tradicional em muitas culturas e que vem ganhando destaque em estudos. Dentre os benefícios notáveis da utilização dos extratos vegetais encontra-se a baixa toxicidade geralmente associada, pois tendem a ser bem tolerados pelo organismo e causam menos efeitos colaterais em comparação com antifúngicos sintéticos, que podem ser tóxicos para as células humanas (GIANNELLI et al., 2008; COELHO et al., 2020). Isso torna os extratos vegetais uma opção promissora, especialmente para tratar infecções por *C. albicans*, como a candidíase oral.

Na perspectiva de novas alternativas para o tratamento de Candidíase oral, a combinação de extratos vegetais com agentes antimicrobianos tornou-se uma opção terapêutica amplamente avaliada. A combinação de agentes considerados ativos frente *C. albicans* podem ser mais úteis do que sua utilização isolada (ZIDA et al., 2017), dado que o sinergismo é descrito como uma

interação positiva entre dois agentes que exercem efeito inibitório maior do que seus efeitos quando utilizados separadamente (TEMITOPE et al., 2017). Assim, a combinação entre plantas medicinais e antimicrobianos sintéticos se configura como opção para o tratamento de infecções com menores dosagens e menos efeitos colaterais (Almeida-Apolonio et al., 2020) e atua como uma possibilidade para conter o desenvolvimento de patógenos (WAGNER ; ULRICH-MERZENICH, 2009).

Com a crescente resistência aos antifúngicos sintéticos, a busca por terapias alternativas é de extrema importância (ZIDA et al., 2017). A identificação e validação de compostos de plantas como candidatos a antifúngicos pode levar a tratamentos mais seguros e eficazes para infecções fúngicas, representando um passo significativo para o combate de patógenos resistentes.

2.4 *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud.

Bauhinia holophylla (Bong.) Steud. pertence à família Fabaceae Lindl. (Leguminosae) e ao gênero *Bauhinia*. Trata-se de uma espécie nativa do Brasil, comumente encontrada no bioma cerrado (CAMAFORTE et al., 2019; SILVA; CECHINEL FILHO, 2002) e conhecida popularmente como pata-de-vaca (RIBEIRO et al., 2018).

Morfologicamente, é caracterizada como um arbusto de folhas coriáceas (figura 2) de 8 a 10 centímetros compostas por dois lobos arredondados unidos na base e separados em forma de V na ponta (LORENZI, 1992) que remetem a pata de um bovino e atribuem tal denominação a planta (CAMAFORTE et al., 2019). Essa conformação peculiar das folhas é resultado de uma adaptação evolutiva da espécie para otimizar a captura de luz solar e a realização da fotossíntese (SILVA; LECHINEL FILHO, 2002). Suas flores (figura 3) geralmente são brancas e arrançadas em ramos axiliares e os frutos constituem-se como vagens achatadas do tipo legume, que medem de 15 a 25 centímetros (LORENZI, 1992).



Figura 2. Folhas de *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. Fonte: A autora (2023).



Figura 3. Flores de *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. Fonte: Carvalho (2023).

Na medicina popular, as folhas de *B. holophylla* são utilizadas para o tratamento de infecções, processos inflamatórios e diabetes (RIBEIRO et al., 2018; CECHINEL FILHO, 2009; SILVA; CECHINEL FILHO, 2002), e na literatura científica, estudos tem demonstrado seu potencial biológico (tabela 1).

Tabela 1. Trabalhos que descrevem o potencial biológico de *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud.

PARTE DA PLANTA	TIPO DE EXTRATO	COMPOSIÇÃO QUÍMICA	ATIVIDADE BIOLÓGICA	AUTORES
Folhas	Hidroalcoólico EtOH/H ₂ O (7:3 v/v)	Derivados de quercetina e miricetina.	Atividade antiúlcera sem indução de efeitos colaterais.	ROZZA et al., 2015
Folhas	Hidroalcoólico EtOH/H ₂ O (7:3 v/v)	Derivados de flavonoides, Quercetina, isorhamentina	Efeito quimioprotetor e protetor no dano ao DNA, não possui efeitos citotóxicos e não induz mutagenicidade.	RIBEIRO et al., 2018
Folhas	Hidroetanólico EtOH/H ₂ O (7:3 v/v)	Flavonoides quercitina e miricetina.	Atividade hipoglicêmica e hipolipidêmica.	CAMAFORTE et al., 2019
Folhas	Hidroalcoólico EtOH/H ₂ O (7:3 v/v)	Flavonoides quercitina e miricetina, litospermosídeo e pinitol.	Efeito hipoglicêmico.	SALDANHA et al., 2021
Folhas	Hidroetanólico (EtOH/H ₂ O - 7:3 v/v) Fração acetato de etila e subfrações	Quercetina	Atividade antidengue (antiviral contra o sorotipo DENV-2).	SANTOS et al., 2021
Folhas	Hidroetanólico	Flavonoides quercetina,	Frações possuem atividade	FONSECA et al., 2022

	(EtOH/H ₂ O - 7:3 v/v) frações diclorometano, acetato de etila) e hidroetanólicas.	miricetina e kaempferol.	antifúngica frente <i>C.</i> <i>albicans</i> .	
--	--	-----------------------------	--	--

Embora *B. holophylla* (Bong.) Steud. apresente um potencial promissor no tratamento de diversas condições, é importante ressaltar que mais estudos são necessários para elucidar completamente suas propriedades e mecanismos de ação. Ainda assim, seu uso tradicional e as evidências científicas iniciais sugerem um potencial para essa espécie como fonte de compostos bioativos com atividade terapêutica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a composição química e atividade antifúngica dos extratos etanólico e aquoso das folhas de *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. frente *Candida albicans*.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar e quantificar a presença de compostos bioativos dos extratos etanólico e aquoso das folhas de *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud.;
- Avaliar a atividade anti-*Candida albicans* dos extratos etanólico e aquoso das folhas de *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud.;
- Avaliar os mecanismos de ação dos extratos etanólico e aquoso das folhas de *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud.;
- Avaliar a atividade sinérgica dos extratos etanólico e aquoso das folhas de *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud com gluconato de clorexidina, nistatina e fluconazol;
- Avaliar a cinética de crescimento de *C. albicans* na presença dos extratos;

- Avaliar a atividade dos extratos etanólico e aquoso das folhas de *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud na formação e destruição de biofilmes de *C. albicans*;
- Avaliar a atividade dos extratos etanólico e aquoso das folhas de *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud na formação de tubos germinativos;
- Avaliar a atividade hemolítica dos extratos de *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud.

4. REFERÊNCIAS

- BABICH, H. et al. Anin vitro study on the cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to human gingival cells. **Cell Biology and Toxicology**, v. 11, n. 2, p. 79–88, 1 abr. 1995.
- BASSO, V. et al. From Genes to Networks: The Regulatory Circuitry Controlling Candida albicans Morphogenesis. Em: RODRIGUES, M. L. (Ed.). **Fungal Physiology and Immunopathogenesis**. Current Topics in Microbiology and Immunology. Cham: Springer International Publishing, p. 61–99, 2019
- BELLMANN, R.; SMUSZKIEWICZ, P. Pharmacokinetics of antifungal drugs: practical implications for optimized treatment of patients. **Infection**, v. 45, n. 6, p. 737–779, 2017.
- BESSA, E. R. L. et al. Epidemiology of oral candidiasis: a household-based population survey in a medium-sized city in Amazonas. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e127101018664–e127101018664, 7 ago. 2021.
- BORGES, C. A. et al. Diagnóstico e formas de tratamento da candidíase oral: uma revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. e359101523123–e359101523123, 28 nov. 2021.
- CAMAFORTE, N. AP. D. P. et al. Hypoglycaemic activity of Bauhinia holophylla through GSK3- β inhibition and glycogenesis activation. **Pharmaceutical Biology**, v. 57, n. 1, p. 269–279, 1 jan. 2019.
- CIUREA, C. N. et al. Candida and Candidiasis—Opportunism Versus Pathogenicity: A Review of the Virulence Traits. **Microorganisms**, v. 8, n. 6, p. 857, jun. 2020.
- COELHO, A. S. et al. Cytotoxic effects of a chlorhexidine mouthwash and of an enzymatic mouthwash on human gingival fibroblasts. **Odontology**, v. 108, n. 2, p. 260–270, 1 abr. 2020.
- CONTALDO, M. et al. Oral Candidiasis and Novel Therapeutic Strategies: Antifungals, Phytotherapy, Probiotics, and Photodynamic Therapy. **Current Drug Delivery**, v. 20, n. 5, p. 441–456, [s.d.].
- CORRÊA, J. L. et al. Propolis extract has bioactivity on the wall and cell membrane of Candida albicans. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 256, p. 112791, 28 jun. 2020.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, jun. 2013.

EREN, K.; ÖZMERİÇ, N.; ŞARDAŞ, S. Monitoring of buccal epithelial cells by alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis technique) in cytogenetic evaluation of chlorhexidine. **Clinical Oral Investigations**, v. 6, n. 3, p. 150–154, 1 set. 2002.

FILHO, V. C. Chemical composition and biological potential of plants from the genus Bauhinia. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 10, p. 1347–1354, out. 2009.

FONSECA, S. T. D. et al. Flavonoid-Rich Fractions of Bauhinia holophylla Leaves Inhibit Candida albicans Biofilm Formation and Hyphae Growth. **Plants**, v. 11, n. 14, p. 1796, 7 jul. 2022.

GHARIBPOUR, F. et al. The Effects of Nutraceuticals and Herbal Medicine on Candida albicans in Oral Candidiasis: A Comprehensive Review. Em: BARRETO, G. E.; SAHEBKAR, A. (Eds.). **Pharmacological Properties of Plant-Derived Natural Products and Implications for Human Health**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 225–248.

GIANNELLI, M. et al. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 22, n. 2, p. 308–317, mar. 2008.

HELLSTEIN, J. W.; MAREK, C. L. Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral Cavity. **Head and Neck Pathology**, v. 13, n. 1, p. 25–32, 1 mar. 2019.

KARAJACOB, A. S. et al. Candida species and oral mycobiota of patients clinically diagnosed with oral thrush. **PLOS ONE**, v. 18, n. 4, p. e0284043, 17 abr. 2023.

KORNITZER, D. Regulation of Candida albicans Hyphal Morphogenesis by Endogenous Signals. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 1, p. 21, mar. 2019.

LORENZI, H. Árvores brasileiras. Manual de identificação, Editora Plantarum Ltda, Nova Odessa, 1992.

LU, S.-Y. Oral Candidosis: Pathophysiology and Best Practice for Diagnosis, Classification, and Successful Management. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 7, p. 555, 13 jul. 2021.

MILLSOP, J. W.; FAZEL, N. Oral candidiasis. **Clinics in Dermatology**, v. 34, n. 4, p. 487–494, 2016.

NAGLIK, J. R. et al. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 12–13, p. 963–976, nov. 2011.

PATEL, M. Oral Cavity and *Candida albicans*: Colonisation to the Development of Infection. **Pathogens**, v. 11, n. 3, p. 335, mar. 2022.

PATIL, S. et al. Clinical Appearance of Oral *Candida* Infection and Therapeutic Strategies. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1391, 17 dez. 2015.

PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 7, p. 792–798, 1 jul. 2019.

RIBEIRO, D. L. et al. Phytochemical study and evaluation of cytotoxicity, mutagenicity, cell cycle kinetics and gene expression of *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. in HepG2 cells in vitro. **Cytotechnology**, v. 70, n. 2, p. 713–728, 1 abr. 2018.

RODRIGUES, C. F.; RODRIGUES, M. E.; HENRIQUES, M. C. R. Promising Alternative Therapeutics for Oral Candidiasis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 14, p. 2515–2528(14), 01 abr. 2019.

ROZZA, A. L. et al. Antiulcerogenic Activity and Toxicity of *Bauhinia holophylla* Hydroalcoholic Extract. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, 2015.

SALDANHA, L. L. et al. Hypoglycemic active principles from the leaves of *Bauhinia holophylla*: Comprehensive phytochemical characterization and in vivo activity profile. **PLOS ONE**, v. 16, n. 9, p. e0258016, 24 set. 2021.

SANTOS, G. O. DOS et al. Chlorhexidine with or without alcohol against biofilm formation: efficacy, adverse events and taste preference. **Brazilian Oral Research**, v. 31, p. e32, 4 maio 2017.

SANTOS, M. D. et al. *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. leaves-derived extracts as potent anti-dengue serotype 2. **Natural Product Research**, v. 35, n. 16, p. 2804–2809, 12 ago. 2021.

SAWANT, B.; KHAN, T. Recent advances in delivery of antifungal agents for therapeutic

management of candidiasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1478–1490, dez. 2017.

SCHEIBLER, E. et al. Use of nystatin and chlorhexidine in oral medicine: Properties, indications and pitfalls with focus on geriatric patients. **Gerodontology**, v. 34, n. 3, p. 291–298, set. 2017.

SHAO, T.Y. et al. Friendly fungi: symbiosis with commensal *Candida albicans*. **Trends in Immunology**, v. 43, n. 9, p. 706–717, set. 2022.

SHARMA, A. Oral Candidiasis: An Opportunistic infection- A Review. v. 5, p. 23–27, 2 fev. 2019.

SILVA, K. L. DA; CECHINEL FILHO, V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v. 25, p. 449–454, maio 2002.

SINGH, A. et al. Oral candidiasis: An overview. **Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP**, v. 18, n. Suppl 1, p. S81-85, set. 2014.

TAKASHIMA, M.; SUGITA, T. Taxonomy of Pathogenic Yeasts *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, and *Trichosporon*. **Medical Mycology Journal**, v. 63, n. 4, p. 119–132, 2022.

TALAPKO, J. et al. *Candida albicans*—The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 79, fev. 2021.

TAYLOR, M.; BRIZUELA, M.; RAJA, A. Oral Candidiasis. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024.

TEMITOPE, O. O. et al. Synergistic antibacterial and antifungal activities of *Spondias mombin* extracts and conventional antibiotic and antifungal agents on selected clinical microorganisms. **Sch. J. Appl. Med. Sci**, v. 5, p. 307-318, 2017.

VAZ, A.M.S.F. (*Bauhinia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil). Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015.

VILA, T. et al. Oral Candidiasis: A Disease of Opportunity. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 15, 16 jan. 2020.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: Approaching a new generation

of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, n. 2, p. 97–110, 1 mar. 2009.

WILLIAMS, D. W. et al. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. **Journal of Oral Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 22434, 1 jan. 2013.

ZHOU, X. et al. The potential role of plant secondary metabolites on antifungal and immunomodulatory effect. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1–22, 5 jun. 2023.

ZIDA, A. et al. Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 27, n. 1, p. 1–19, 1 mar. 2017.

5. ANEXOS