

CIÊNCIAS DA SAÚDE



**Nayara Araújo Cardoso
Renan Rhonalty Rocha
(Organizadores)**

Atena
Editora

Ano 2019

Nayara Araújo Cardoso
Renan Rhonaly Rocha
(Organizadores)

Ciências da Saúde

Atena Editora
2019

2019 by Atena Editora

Copyright © da Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação e Edição de Arte: Geraldo Alves e Natália Sandrini

Revisão: Os autores

Conselho Editorial

- Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Profª Drª Deusilene Souza Vieira Dall’Acqua – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Profª Drª Juliane Sant’Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

C569 Ciências da saúde [recurso eletrônico] / Organizadores Nayara Araújo Cardoso, Renan Rhonalty Rocha. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2019. – (Ciências da Saúde; v. 1)

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia.

ISBN 978-85-7247-126-8

DOI 10.22533/at.ed.268191802

1. Automedicação. 2. Saúde – Ciência. I. Cardoso, Nayara Araújo. II. Rocha, Renan Rhonalty. III. Série.

CDD 614.4

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores.

2019

Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

www.atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

A obra “*As Ciências da Saúde*” aborda uma série de livros de publicação da Atena Editora, em seus 15 capítulos do volume I, apresenta a importância da farmacovigilância com o desenvolvimento de estudos relacionados com biomoléculas ativas na melhoria da qualidade de vida de pacientes, numa perspectiva farmacológica por meio do desenvolvimento e utilização de novas terapias farmacêuticas.

A farmacovigilância se relaciona em todos os aspectos com a utilização de medicamentos, desde seu desenvolvimento com estudos preliminares e laboratoriais a sua utilização empírica ou científica, sendo assim, trata-se da ciência que desempenha atividades relativas à identificação, avaliação, compreensão e prevenção de efeitos adversos ou quaisquer problemas relacionados ao uso de medicamentos. Desta forma, cabe a ela identificar, avaliar e monitorar a ocorrência dos eventos adversos relacionados ao uso dos medicamentos comercializados no mercado brasileiro, com o objetivo de garantir que os benefícios relacionados ao uso desses produtos sejam maiores que os riscos por eles causados.

Atualmente, o desenvolvimento de medicamentos no Brasil se baseia majoritariamente na utilização de produtos naturais. As plantas fornecem uma gama de compostos bioativos que podem ser utilizados das mais diversas formas em medicamentos, possuindo, assim, ações antifúngicas, antibacterianas, antioxidantes, antidiabéticas, entre outros.

A união entre o desenvolvimento e a utilização de medicamentos compõe um viés gigante para o cuidado com o paciente, uma vez que medicamentos, se utilizados de forma incorreta, tem elevado potencial de causar mal.

Colaborando com tais descobertas este volume I é dedicado aos pesquisadores na área da saúde que buscam um melhor entendimento sobre o desenvolvimento e uso de moléculas bioativas. Trazendo artigos que abordam a avaliação da atividade de diversos compostos biologicamente ativos de plantas; do ácido gálico sobre a formação de biofilme por *Candida albicans*; da radiopacidade de cimentos de ionômero de vidro indicados para tratamento restaurador atraumático; da eficiência da síntese de nanopartículas de prata em extrato de *Beta vulgaris* para aplicação em têxteis com atividade antimicrobiana; e a análise do uso de medicamentos já produzidos e os danos causados por eles, bem como a automedicação.

Ademais, esperamos que este livro possa mudar a perspectiva do leitor sobre o uso inadequado de medicamentos, colaborando e instigando pesquisadores a conhecer o desenvolvimento de novas drogas e impacto social e econômico do seu uso pela sociedade.

Nayara Araújo Cardoso
Renan Rhonalty Rocha

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
AVALIAÇÃO DA AUTOMEDICAÇÃO REALIZADA POR ALUNOS E FUNCIONÁRIOS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS, UNIDADE DE ITUMBIARA	
Stéphanie Naoum Flávia Borges Carapina Santos Bruna Oliveira da Silva Carvalho	
DOI 10.22533/at.ed.2681918021	
CAPÍTULO 2	18
AS CONTRIBUIÇÕES DA PAPAÍNA COMO MÉTODO TERAPÊUTICO: UM ESTUDO DESCRITIVO DOCUMENTAL	
Isabelle Cristine Figueiredo Matozo Elizabeth Amâncio de Souza da Silva Valsecchi Eduardo Felipe Duarte Nunes Jorseli Angela Henriques Coimbra Maria Emília Grassi Busto Miguel Regina Lucia Dalla Torre Silva Cely Cristina Martins Gonçalves	
DOI 10.22533/at.ed.2681918022	
CAPÍTULO 3	24
ANÁLISE RETROSPECTIVA DO USO DE ANTIRRETROVIRAIS PARA HIV EM PACIENTES DE UMA UNIDADE DE SAÚDE EM ANÁPOLIS-GO	
Iris Iasmine de Rezende Araújo Chálita Patrícia de Lima	
DOI 10.22533/at.ed.2681918023	
CAPÍTULO 4	38
AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA RADIOPACIDADE DE CIMENTOS DE IONÔMERO DE VIDRO INDICADOS PARA TRATAMENTO RESTAURADOR ATRAUMÁTICO	
Karlla Almeida Vieira Pedro Affonso Ferreira De Menezes Yann Victor Paiva Bastos Saskia de Souza Pordeus Clarissa Moraes Bastos Clóvis Stephano Pereira Bueno	
DOI 10.22533/at.ed.2681918024	
CAPÍTULO 5	51
ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DO COMPLEXO ÁCIDO 3,4-CINÂMICO/RUTÊNIO (II) [RU(3,4CIN)(DPPB)(BIPY)]PF6] SOBRE CÉLULAS DERIVADAS DE CARCINOMA DE PULMÃO	
Gabriel Soares Guerra	
DOI 10.22533/at.ed.2681918025	

CAPÍTULO 6 64

ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTITUMORAL DO COMPLEXO METÁLICO DE COBRE (II) [Cu(Phen)₂]
(ClO₄)₂

Fernanda Cardoso da Silva
Françoise Vasconcelos Botelho
Suelen Fernandes Silva
Pedro Henrique Alves Machado
Lorena Polloni
Elene Cristina Pereira Maia
Priscila Pereira Silva Caldeira
Robson José de Oliveira Júnior

DOI 10.22533/at.ed.2681918026

CAPÍTULO 7 78

AValiação DA ATIVIDADE DO ÁCIDO GÁLICO SOBRE A FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Candida albicans*

Chálita Patrícia de Lima
Iris Iasmine de Rezende Araújo

DOI 10.22533/at.ed.2681918027

CAPÍTULO 8 89

COMPOSTOS BIOATIVOS DE PLANTAS: UM POTENCIAL PARA ANTIMICROBIANOS E ANTIOXIDANTES

Deyzi Caroline da Silva Barbosa
Paloma Maria da Silva
Bruno Oliveira de Veras
Fernanda Granja da Silva Oliveira
Alexandre Gomes da Silva
Márcia Vanusa da Silva
Maria Tereza dos Santos Correia

DOI 10.22533/at.ed.2681918028

CAPÍTULO 9 98

TREINAMENTO RESISTIDO NA SÍNDROME SAPHO ASSOCIADA AO USO DA ISOTRETINOINA: UM ESTUDO DE CASO

Hellen Christina de Belmont Sabino Medeiros
Rodrigo Ramalho Aniceto
Vinicius de Gusmão Rocha
Antônio Meira Neto
Cybelle de Arruda Navarro Silva

DOI 10.22533/at.ed.2681918029

CAPÍTULO 10 107

TRATAMENTO HOMEOPÁTICO DA DENGUE

Hezraitá Vieira Cruz dos Santos
Murilo Ferreira de Carvalho
Sandra Ribeiro de Moraes

DOI 10.22533/at.ed.26819180210

CAPÍTULO 11	121
USE OF PATCH TEST TO DETERMINE THE PREVALENCE OF NICKEL ALLERGY IN CHILDREN AGED 5–12 YEARS	
Paula Guerino	
Bruna Torrel	
Leandro Berni Osório	
Kivia Linhares Ferrazzo	
Renésio Armindo Grehs	
Vilmar Antônio Ferrazzo	
DOI 10.22533/at.ed.26819180211	
CAPÍTULO 12	129
USO DE FÁRMACOS PROMOVE AUMENTO NA CESSAÇÃO DO TABAGISMO	
Miyoko Massago	
Maria Lúcia Dantas	
Idalina Diair Regla Carolino	
Celso Ivam Conegero	
DOI 10.22533/at.ed.26819180212	
CAPÍTULO 13	136
USO DO FITOTERÁPICO <i>Phyllanthus niruri</i> L. (QUEBRA-PEDRA) COMO ALTERNATIVA TERAPÉUTICA DA LITÍASE RENAL	
Osmaysa Feitoza da Silva	
Diêla dos Santos Cunha	
Jose Augusto Nascimento da Silva	
Karoline da Silva Torres	
Liriane Andressa Alves da Silva	
Lucas Barbosa de Araujo Leal	
Maiana Marques Rocha	
Maria de Fatima Sousa Barros Vilarinho	
Tamires da Cunha Soares	
Ticianne da Cunha Soares	
DOI 10.22533/at.ed.26819180213	
CAPÍTULO 14	143
ESTUDO DA EFICIÊNCIA DA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM EXTRATO DE BETA VULGARIS PARA APLICAÇÃO EM TÊXTEIS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	
Otávio Augusto Leitão dos Santos	
Bianca Pizzorno Backx	
DOI 10.22533/at.ed.26819180214	
CAPÍTULO 15	158
HEMO MATCH: UM APLICATIVO PARA LOCALIZAÇÃO DE FENÓTIPOS COMPATÍVEIS	
Ana Luiza Costa	
Bianca Costa de Lima	
Daniele Freires de Oliveira	
Verônica Magna de Lima	
Wesley Fernandes de Carvalho	
DOI 10.22533/at.ed.26819180215	
SOBRE OS ORGANIZADORES	168

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO ÁCIDO GÁLICO SOBRE A FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Candida albicans*

Chálita Patrícia de Lima

Universidade Estadual de Goiás - UEG
Anápolis – Goiás

Iris Iasmirine de Rezende Araújo

Universidade Estadual de Goiás - UEG
Anápolis – Goiás

RESUMO: A espécie *Candida albicans* é a levedura responsável pela maioria das infecções fúngicas. Tais leveduras são micro-organismos oportunistas presentes na microbiota normal dos seres humanos sem, contudo, ocasionar processos patológicos em indivíduos saudáveis. Os fatores de virulência destas leveduras têm um papel essencial na gênese das infecções e a capacidade de formação de biofilmes constitui-se num dos principais fatores de virulência do fungo. O biofilme é uma estrutura altamente organizada que propicia a persistência, colonização, invasão e disseminação da levedura e confere uma comprovada resistência aos antifúngicos devido à difícil penetração e difusão de fármacos no biofilme. Considerando que o ácido gálico apresenta grande diversidade de atividades biológicas descritas, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de analisar a atividade deste composto sobre a formação de biofilmes por *C. albicans*, com uma possível inovadora ferramenta terapêutica. Foi estudada a formação de biofilme por 13 estirpes de *C.*

albicans, a determinação da concentração mínima inibitória do ácido gálico para estas leveduras e o impacto de concentrações subinibitórias com o cálculo do índice de formação de biofilme na presença do composto. Os resultados mostraram que o ácido gálico não apresentou atividade antifúngica significativa nas concentrações testadas, não sendo observada inibição superior a 50% do crescimento das leveduras, mesmo na maior concentração (500 $\mu\text{g/mL}$). Em relação ao impacto da formação de biofilme na presença do composto, verificou-se que todas as amostras formaram biofilme, duas cepas apresentaram um aumento significativo deste fator de virulência e nas restantes não foi observado redução.

PALAVRAS-CHAVE: Ácido gálico, *Candida albicans*, biofilme, crescimento.

ABSTRACT: The species *Candida albicans* is the yeast responsible for most fungal infections. These yeasts are opportunistic microorganisms present in the normal human microbiota without, however, causing pathological processes in healthy individuals. The virulence factors of these yeasts have an essential role in the genesis of infections and the capacity of biofilm formation is one of the main virulence factors of the fungus. Biofilm is a highly organized structure that promotes the persistence, colonization, invasion and dissemination

of yeast and provides a proven resistance to antifungal agents due to the difficult penetration and diffusion of drugs in the biofilm. Considering that gallic acid has a great diversity of described biological activities, this work was developed with the objective of analyzing the activity of this compound on the formation of biofilms by *C. albicans*, with a possible innovative therapeutic tool. The biofilm formation by 13 strains of *C. albicans* was studied, the determination of the minimum inhibitory concentration of gallic acid for these yeasts and the impact of subinhibitory concentrations by the calculation index of biofilm formation in the presence of the compound. The results showed that gallic acid did not present significant antifungal activity in the tested concentrations, and that no more than 50% of the yeast growth was inhibited at the highest concentration (500 µg/mL). Concerning the impact of biofilm formation in the presence of the compound, it was observed that all samples produced biofilm, two strains showed a significant increase of this factor and the remaining strains did not present reduction in the biofilm production.

KEYWORDS: Gallic acid, *Candida albicans*, biofilm, growth.

1 | INTRODUÇÃO

Os fungos representam uma importante causa de infecções humanas e dentre eles as leveduras do gênero *Candida* são consideradas uma das mais prevalentes (MORAN *et al.*, 2011). *Candida albicans* é o principal patógeno de origem fúngica responsável pela maioria das infecções nosocomiais (PRESCOTT *et al.*, 2002).

As leveduras do gênero *Candida albicans* são fungos dimórficos encontrados como patógenos oportunistas ou como comensais. Estes últimos estão presentes na microbiota normal de seres humanos, como no trato gastrointestinal, respiratório, urogenital e na área da boca, sendo consideradas, portanto, como espécies inócuas em indivíduos saudáveis (PRESCOTT *et al.*, 2002, RAMAGE *et al.*, 2001).

Entretanto, determinados fatores, tais como terapia imunossupressora, antibioticoterapia, infecção por HIV, uso de catéteres, diabetes e idade avançada, podem induzir estas leveduras a se comportarem como patógenos oportunistas e causar uma variedade de doenças, tais como a candidíase ou candidose até, inclusive, infecções sistêmicas mais severas, sendo encontradas em 50% dos casos de análise de infecção sistêmica (PRESCOTT *et al.*, 2002, RAMAGE *et al.*, 2001).

Além de características inerentes ao paciente, fatores de virulência dessa levedura desempenham papel essencial na gênese e desenvolvimento do processo infeccioso. A habilidade de produzir adesinas, enzimas hidrolíticas, principalmente proteinases e fosfolipases, de se multiplicar em temperaturas compreendidas entre 39 °C e 42 °C, de alternar da forma de levedura unicelular para hifas filamentosas (dimorfismo) e capacidade de formação de biofilmes, constituem os principais fatores de virulência descritos em *Candida albicans* (RÖRIG *et al.*, 2009, MORAN *et al.*, 2011).

Biofilmes são comunidades microbianas estruturadas associadas a superfícies,

sendo que a transição entre as formas leveduriforme e filamentosa constitui uma característica essencial no desenvolvimento destas estruturas pela *C. albicans* (RAMAGE *et al.*, 2002). Isto porque as células de levedura tem papel importante na colonização inicial e proliferação nas superfícies, enquanto que as hifas atuam na invasão, adesão e posterior formação de biofilmes (MORAN *et al.*, 2011).

Por consequência, a formação de biofilmes implica em profundas complicações clínicas, dentre elas a susceptibilidade reduzida a antimicrobianos e biocidas devido a difícil penetração e difusão de fármacos no biofilme, e a maior resistência contra as defesas do hospedeiro, pois dificulta a fagocitose pelas células do sistema imune (RAMAGE *et al.*, 2001, SANTANA *et al.*, 2010).

Os avanços dos estudos sobre os mecanismos de virulência destes micro-organismos, incluída a formação de biofilmes, tem propiciado a melhoria do conhecimento sobre a relação destes fatores com o fenômeno de resistência aos antimicrobianos (MORAN *et al.*, 2011).

De maneira complementar, o acúmulo destes conhecimentos favorecem as investigações sobre a inibição desses mecanismos como estratégia de controle dos micro-organismos. Dentre as novas propostas encontra-se a avaliação da atividade de compostos naturais sobre a formação de biofilmes de *C. albicans*. Tais compostos com potencial antimicrobiano podem ser isolados de extratos e óleos essenciais produzidos pelas plantas (ALVES, 2007).

Um dos compostos produzidos pelas plantas é o ácido gálico, encontrado no metabolismo secundário de plantas, e originado por diferentes reações bioquímicas do ácido chiquímico, um intermediário do metabolismo da glicose (SANTOS, 2007; ROSSO, 2005).

O ácido gálico quimicamente é denominado como ácido 3,4,5 - tri-hidroxi-benzóico e consiste em uma estrutura fenólica tri-hidroxilada, constituinte básico de taninos hidrolisáveis, sendo encontrado amplamente em plantas lignificadas (GRUNDHÖFER *et al.*, 2001).

Este composto possui várias atividades biológicas já descritas. Há relatos do século XVIII de sua utilização para o tratamento de microalbuminúria (SAMPSON, 1849; LYELL, 1849). Possui atividade antimalárica (THOMPSON *et al.*, 1953); anti-inflamatória (KROES *et al.*, 1992); tripanocida contra *Trypanosoma brucei brucei* (KOIDE *et al.*, 1998); analgésica comparável ou superior ao ácido acetilsalicílico e paracetamol (KROG *et al.*, 2000); antitumoral em células leucêmicas (LOCATELLI *et al.*, 2009); antioxidante (ALVES, 2007); protetora sobre as células neuronais por reduzir a granulação e, conseqüentemente expressão de citocinas (KIM *et al.*, 2011); antienvhecimento, reduzindo os valores de rugosidade na pele humana (MANOSROI *et al.*, 2011); antifúngica contra *Fusarium semitectum*, *Fusarium fusiformis* e *Alternaria alternata* por ter restringido a produção de micotoxinas (POLEWSKI *et al.*, 2002).

Além do próprio ácido gálico, os seus derivados também são amplamente utilizados nas indústrias alimentícias, químicas, farmacêuticas e de cosméticos.

Alguns estudos tem demonstrado que estas substâncias apresentam potencialidade terapêutica, principalmente como anticarcinogênica, antimicrobiana, antiviral, além de atuarem como sequestradores de espécies reativas de oxigênio (ALVES, 2007).

2 | OBJETIVO

Diante deste contexto e da relevância dos biofilmes para resistência e colonização tanto de tecidos como de superfícies inertes, o objetivo deste trabalho foi determinar a concentração mínima inibitória do ácido gálico e estudar o seu impacto sobre a formação de biofilmes de cepas de *Candida albicans*.

3 | METODOLOGIA

Foram estudadas um total de 13 cepas, sendo 12 isolados clínicos de *Candida albicans* e a cepa ATCC 10231. O ácido gálico foi adquirido da *Sigma Chemical Company*. As cepas de *Candida albicans* foram testadas quanto à suscetibilidade *in vitro* ao ácido gálico para determinação da concentração mínima inibitória (CMI), a qual serviu de base para avaliar a atividade do composto em estudo sobre a formação de biofilme das cepas em questão.

3.1 Teste de susceptibilidade *in vitro*

A atividade antifúngica do ácido gálico foi realizada por meio da técnica de microdiluição adaptada de Petit *et al.* (2005). Leveduras de *Candida* foram cultivadas em ágar Sabouraud Dextrose (ASD) por 48 horas a 35 ± 2 °C. A suspensão foi preparada dissolvendo-se 5 colônias isoladas em 5 ml de solução fisiológica estéril (SFE) e a densidade celular ajustada diluindo 100 µL em 4,9 mL de SFE e posteriormente diluindo 250 µL em 4750 µL de meio de cultura YNB (*Yeast Nitrogen Base*) resultando em um inóculo de aproximadamente $5,0 \times 10^3$ ufc/mL.

Foram pesados 10 mg, considerando 100% de pureza do ácido gálico que, em seguida, foram dissolvidas em 0,5 mL de dimetil sulfoxido (DMSO). Transferiram-se 250 µL da solução inicial de ácido gálico para um microtubo com 250 µL de SFE. A seguir, 500 µL desta solução foram transferidos para outro tubo com 4500 µL de meio sintético YNB.

Para a realização da microdiluição foram utilizadas placas microtiter de poliestireno com 96 orifícios (placa de Elisa) de fundo chato e com tampa. Nos poços da coluna 1 foram dispensados 100 µL do ácido gálico diluído no YNB. Nos demais poços a partir da coluna 2 foram dispensados 75 µL do meio sintético YNB, até a coluna 6. Em seguida iniciou-se a diluição seriada do ácido gálico retirando-se 25 µL da coluna 1 para a coluna 2 e assim sucessivamente até a coluna 5 obtendo as seguintes concentrações: 500; 125; 31,25; 7,81 e 1,95 µg/ML sendo a coluna 6 o

controle positivo (Figura 1). Em seguida, colocou-se 75 µl da suspensão contendo o inóculo nos poços horizontalmente, cada cepa em uma linha, sendo que a linha H não se colocou inóculo, ficando esta como controle negativo. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 48 horas (Figura 2).

O crescimento dos micro-organismos foi verificado pela análise visual e leitura da densidade óptica à 630nm (DO_{630nm}) em espectrofotômetro e calculou-se o percentual dos poços teste frente aos controles positivos sem ácido gálico.

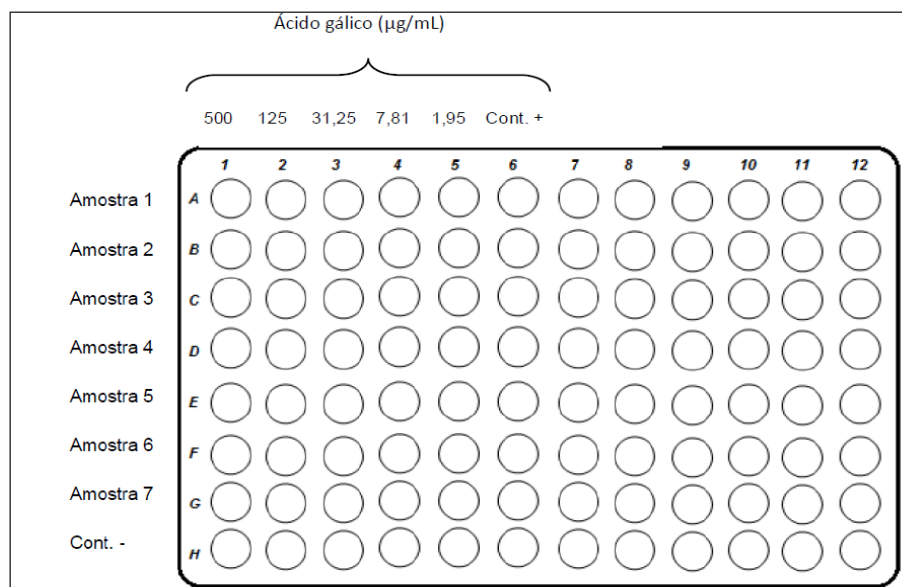


Figura 1. Organização das amostras e do composto químico na placa de Elisa.

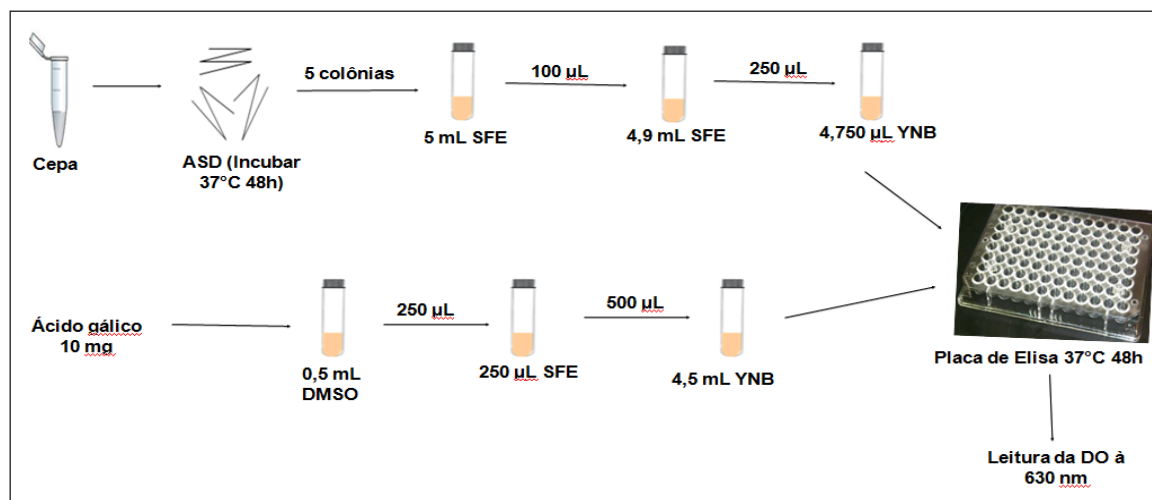


Figura 2. Esquema do ensaio para determinação da concentração mínima inibitória do ácido gálico. Legenda: ASD = Ágar Sabouraud Dextrose; SFE = Solução Fisiológica Estéril; YNB = Yeast Nitrogen Base; DMSO = Dimetil sulfóxido; DO = Densidade óptica

3.2 Avaliação sobre a formação de biofilme

As cepas foram inoculadas em ASD a 35 ± 2 °C por 48 horas, a seguir três colônias transferidas para um tubo contendo 1 mL de Caldo Sabouraud Dextrose (CSD), e outras três colônias para outro tubo com 10 mg de ácido gálico dissolvido em 20 mL de CSD, para se obter a concentração de 500 µg/mL. Homogeneizaram-se os tubos.

Com uma pipeta multicanal transferiu-se 200 μL do caldo crescido para poços em placas microtiter de poliestireno, sendo que nas linhas de A à D foi adicionado somente o CSD contendo a cepa (controle positivo), e nos poços das linhas de E a H foi CSD com ácido gálico dissolvido mais a cepa. Os poços da última coluna da placa foram utilizados como controle negativo (C-).

Incubou-se a placa a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas. Fez-se a leitura visual e mediu-se a $\text{DO}_{630\text{nm}}$ na leitora de Elisa. Em seguida foi feito o processamento da placa:

1. Removeu-se o caldo com pipeta multicanal.
2. Lavaram-se os poços com 200 μL SFE 1 vez.
3. Secou-se à temperatura ambiente por 20 minutos.
4. Coraram-se os poços com 200 μL de Cristal Violeta 1%, o qual foi removido após 15 minutos.
5. Lavaram-se os poços com 300 μL de água destilada 4 vezes.
6. Secou-se à $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 20 minutos.
7. Adicionaram-se 200 μL de etanol absoluto.
8. Incubou-se a placa à temperatura ambiente por 5 minutos.

Por fim fez-se a leitura da densidade óptica à 492 nm.

As DO obtidas permitiram o cálculo do índice de Formação de Biofilme (FB) por meio da fórmula $\text{FB} = \text{DO}_{\text{LA}} / \text{DO}_{\text{PC}}$, aonde LA = levedura aderida, PC = poço controle (Figura 3).

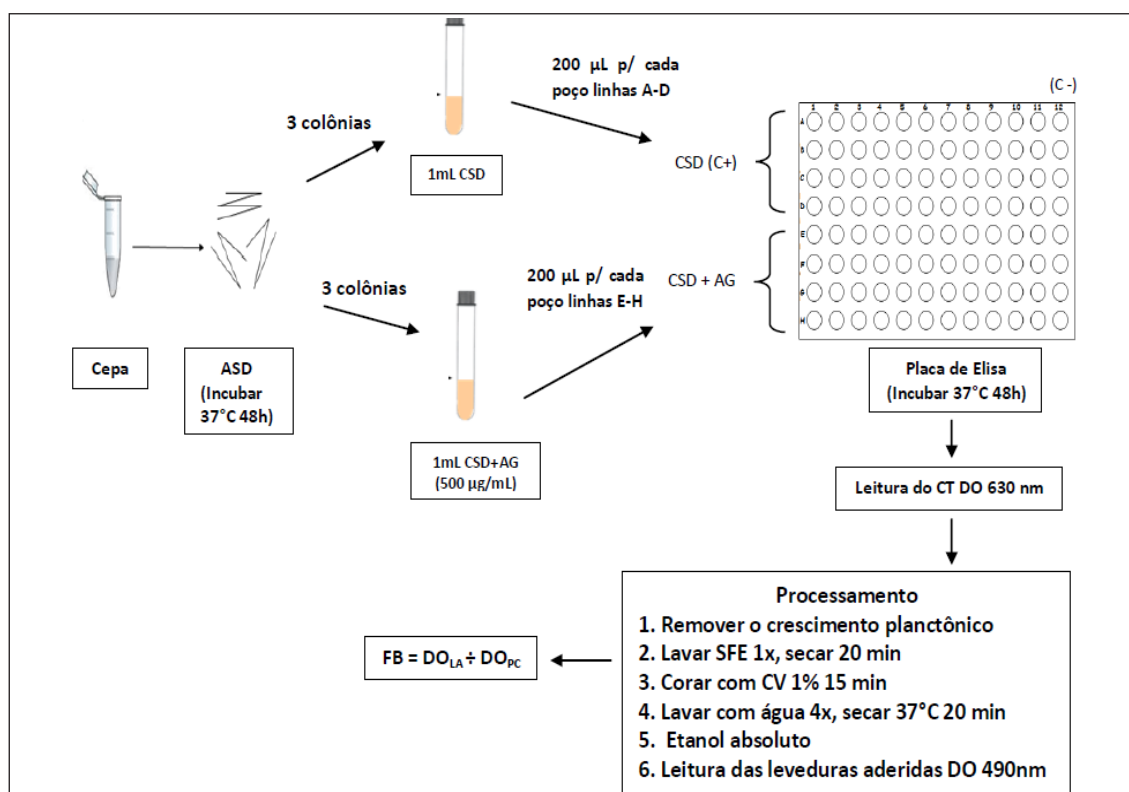


Figura 3. Esquema dos ensaios para a formação de biofilme no meio de cultura caldo Sabouraud dextrose (CSD).

3.3 Análise estatística

Para avaliar se as diferenças foram estatisticamente significativas foi realizado o teste t Student pareado, com $p < 0,05$. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em experimentos independentes com a inclusão de controles positivos e negativos.

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de suscetibilidade *in vitro* permitiu verificar o grau de inibição das leveduras pelo ácido gálico (Concentração Mínima Inibitória - CMI). As inibições causadas pelas diferentes concentrações do ácido gálico estão expressas em porcentagem frente aos controles positivos não expostos (Tabela 1).

Foi verificado que na maior concentração testada (500 $\mu\text{g/mL}$) as cepas que tiveram maior inibição de crescimento na presença de ácido gálico foram as estirpes Ca 14, Ca 30, Ca 23. Enquanto que as cepas Ca 24 e ATCC foram as que obtiveram maior taxa de crescimento.

<i>C. albicans</i>	Ácido Gálico ($\mu\text{g/mL}$)				
	500	125	31,25	7,81	1,95
Ca11	56,2	66,7	73,1	76,1	81,6
Ca14	52,0	61,4	71,7	75,2	83,8
Ca17	61,6	65,5	79,9	87,0	93,3
Ca19	56,6	76,8	87,7	93,4	96,9
Ca22	56,1	69,7	76,5	84,9	89,1
Ca23	52,6	54,4	60,1	67,4	71,6
Ca24	67,3	87,9	90,1	93,8	98,2
Ca26	57,1	66,5	73,4	76,6	79,1
Ca30	52,3	67,8	75,2	80,7	81,2
Ca34	54,6	63,1	71,6	77,2	87,1
Ca36	55,1	65,5	70,6	83,6	88,1
Ca40	56,5	68,5	73,1	83,0	91,9
ATCC	67,3	72,2	77,7	86,7	92,2

Tabela 1. Taxa de crescimento (em %) das cepas de *Candida albicans* expostas às diferentes concentrações de ácido gálico, frente ao controle positivo. Legenda: Ca = *Candida albicans*; ATCC = American Type Culture Collection.

Acredita-se que devido ao fato de que este composto ser facilmente oxidável, tanto através de enzimas vegetais específicas quanto por influência de metais (como ferro e manganês), da luz e do calor, ou do meio alcalino, possa ter havido uma redução na sua atividade antimicrobiana (SANTOS; MELLO, 2007). E apesar das inibições não superarem 50%, tais resultados são significativos, pois o presente estudo será continuado no intuito de avaliar a ação de concentrações subinibitórias deste composto contra fatores de virulências, notadamente a formação de biofilme.

Petrônio *et al.* (2009), avaliou a atividade antifúngica do ácido gálico e de oito

ésteres derivados do mesmo através da técnica de microdiluição em caldo contra *Candida albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Os ésteres apresentaram CMI iguais ou superiores a 125 µg/mL, frente aos fungos do gênero *Candida*, mostrando-se menos potentes que o ácido gálico (CMI = 62,5 µg/mL).

Já no estudo realizado por Leal *et al.* (2009) analisando a capacidade antifúngica de uma série de n-alkil galatos, incluindo o ácido gálico, contra fungos patogênicos oportunistas, observou-se que a CMI de ácido gálico, que inibiu completamente o crescimento das leveduras de *C. albicans*, foi >250 µg/mL.

As literaturas citadas acima apontam que o ácido gálico possui capacidade de inibir o crescimento de *C. albicans*, o que diverge dos resultados verificados nesse estudo. Pressupõe-se que tal divergência seja reflexo das diferentes metodologias utilizadas, visto que a literatura preconiza como método de referência as diretrizes do CLSI - M27A3 (Clinical and Laboratory Standards Institute), recomendando como meio de cultura o RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) acrescido de solução-tampão MOPS, e neste estudo fez-se uma adaptação na metodologia utilizando-se meio sintético YNB para se adequar às condições de realização do experimento.

Como não houve inibição de mais de 50% das cepas no teste de susceptibilidade *in vitro*, a concentração de ácido gálico utilizada nos ensaios de formação de biofilme foi estipulada em 500 µg/mL.

No gráfico 1 são apresentados os índices de formação de biofilme pelas leveduras estudadas, sendo demonstrado o impacto da presença do ácido gálico na formação de tal fator de virulência. Em nossas condições experimentais todas as amostras foram capazes de formar biofilme.

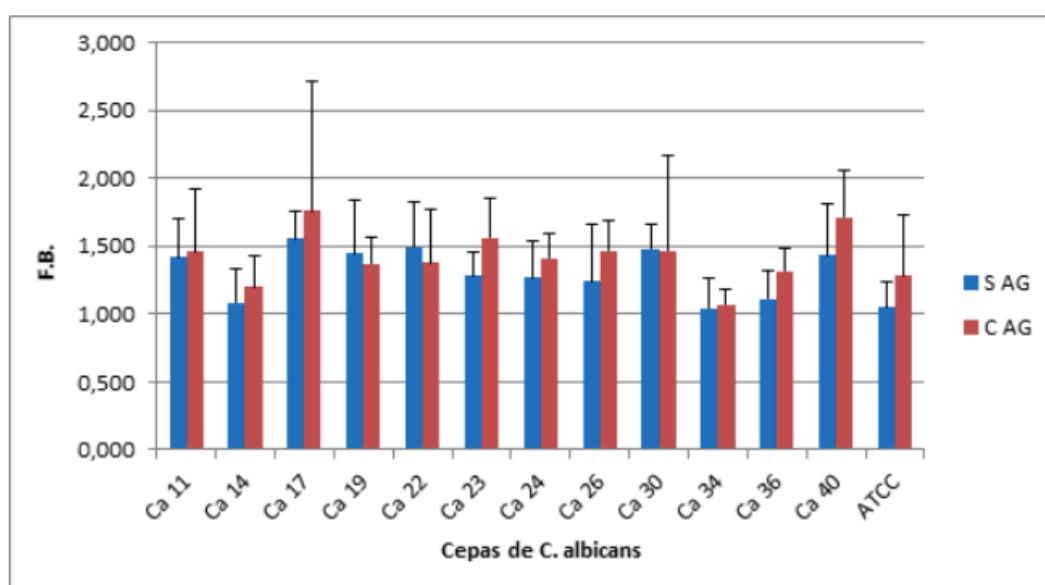


Gráfico 1. Índice de formação de biofilme por *C. albicans* na ausência e na presença de ácido gálico. Legenda: FB = formação de biofilme; S AG = sem ácido gálico; C AG = com ácido gálico; Ca = *Candida albicans*; ATCC = American Type Culture Collection.

As diferenças encontradas frente à presença e a ausência do composto em

estudo foram discretas. Apenas duas leveduras, leia-se Ca 23 e Ca 36, apresentaram diferenças significativas, pois ambas obtiveram resultados superiores, no que diz respeito à formação de biofilme na presença de ácido gálico quando comparado a ausência deste composto.

Para nosso conhecimento, o efeito do composto em questão e alguns derivados sintéticos foram previamente testados quanto à sua atividade anti-*Candida*, mas nenhum fora avaliado quanto ao seu efeito sobre a formação de biofilme por *C. albicans*.

A expressão da produção das enzimas lignolíticas por fungos vem sendo detectada por meio do ácido gálico, que, sob ação das fenoloxidasas, forma quinonas indicativas da oxidação, resultando em um halo de cor âmbar em torno da colônia, comumente chamado de “Reação de Bavendamm” (CONCEIÇÃO *et al.*, 2005).

Estudos realizados por Boonchan *et al.* (2000) e Bonugli-Santos *et al.* (2010) apontaram como os fungos considerados maiores produtores das enzimas lignolíticas os seguintes *Phanerochaete chrysosporium*, *Penicillium* spp., *Paecilomyces* spp., *Cunninghamella elegans*, *Candida* spp., *Torulopsis* sp., *Rhodotorula* sp., *Aspergillus sclerotium*.

Maciel e colaboradores (2010) avaliaram a produção de enzimas lignolíticas (polifenoloxidasas) por fungos filamentosos utilizando óleo diesel como substrato, com a finalidade de propor aplicação futura dessas enzimas na remoção de petroderivados. No estudo o ácido gálico (0,5%) foi utilizado como substrato indutor para a verificação da expressão das enzimas. Os resultados destacaram *Aspergillus* sp., *Curvularia lunata*, *Paecilomyces* sp., e *Penicillium* sp. como os fungos com maior potencial biotecnológico.

Baseado na literatura citada pode-se levantar a hipótese de que as cepas de *C. albicans* do presente trabalho tenham utilizado o ácido gálico no seu metabolismo, influenciando assim a formação de biofilme, o que poderia justificar o aumento da produção deste fator de virulência.

A derivação de moléculas de ácido gálico é uma alternativa para melhorar suas características, podendo assim ser avaliadas em futuros estudos.

5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo avaliou a atividade do ácido gálico na formação de biofilme por *C. albicans*.

A análise da inibição foi feita comparando-se o as cepas na presença e na ausência de ácido gálico. Todas as amostras de *C. albicans* foram consideradas formadoras de biofilme em nossas condições experimentais.

Nos resultados observamos que na presença do ácido gálico as cepas *C. albicans* tiveram um aumento na formação de biofilme, embora tal composto apresente pouca ação antifúngica nos ensaios *in vitro*, já que as cepas mostraram-se resistentes a todas as concentrações utilizadas.

REFERÊNCIAS

- ALVES, C. Q. **Flavonóides antioxidantes e derivados de ácido gálico isolados de *Cenostigma gardnerianum* Tul. (Leguminosae)**. Salvador, Bahia, UFBA, 2007.
- BONUGLI-SANTOS R. C. et al. **Production of laccase manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine derived fungi**. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 46, n. 1, p. 32-37, 2010.
- BOONCHAN, S.; BRITZ, M.L.; STANLEY, G.A. **Degradation and mineralization of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal bacterium cocultures**. *Applied Environmental Microbiology*, v. 66, p. 1007-1019, 2000.
- CLSI, CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard. CLSI Document M27-A3**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
- CONCEIÇÃO, D. M. et al. **Fungos filamentosos isolados do rio Atibaia, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos**. *Arq. Inst. Biol.*, v. 72, n. 1, p. 99-106, 2005.
- GRUNDHOFER, P. et al. **Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins**. *Phytochemistry*, v. 57; p. 915-927, 2001.
- KIM, M. J. et al. **Gallic acid, a histone acetyltransferase inhibitor, suppresses β -amyloid neurotoxicity by inhibiting microglial-mediated neuroinflammation**. *Molecular nutrition & Food Research*, v. 55, p. 1798-1808, 2011.
- KOIDE, T.; NOSE, M.; INQUE, M; OGIHARA, Y.; YABU, Y.; OTHA, N. **Tripanocidal effects of gallic acid and related compound**. *Planta Medica*, v. 64, n. 1, p. 27-30, 1998.
- KROES, B. H.; VAN DEN BERG, A. J. J.; QUARLES VAN UFFORD, H. C.; VAN DIJK, H.; LABADIE, R. P. **Anti-inflammatory activity of gallic acid**. *Planta Medica*, n. 58, p. 499-504, 1992.
- KROGH, R.; TUNES, R. A.; ANDRICOPULO, A. D. **Structure-activity relationships for the analgesic activity of gallic acid derivatives**. *Il Farmaco*, n.55, p. 730-735, 2000.
- LEAL, P. C. et al. **Relation between lipophilicity of alkyl gallates and antifungal activity against yeasts and filamentous fungi**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 19, p. 1793–1796, 2009.
- LOCATELLI, C. et al. **Gallic Acid Ester Derivatives Induce Apoptosis and Cell adhesion Inhibition in Melanoma Cells: The Relationship Between Free Radical Generation, Glutathione and Cell Death**. *Chemico-Biological Interactions*, p. 157-184, 2009.
- LYELL, J. **On the use of gallic acid in the treatment of albuminuria**. *The Lancet*, v. 54, p. 608 – 609, 1849.
- MACIEL, C. do C. S. et al. **Produção de enzimas do sistema lignolítico por fungos filamentosos isolados de locais impactados por petroderivados**. *Exacta*, São Paulo, v. 8, n. 3, p. 299-305, 2010.
- MANOSROI, A. et al. **In vitro and in vivo skin anti-aging evaluation of gel containing niosomes loaded with a semi-purified fraction containing gallic acid from *Terminalia chebula* galls**. *Pharmaceutical Biology, Chiang Mai*, v. 49, n. 11, p. 1190-1203, nov. 2011.
- MELO, A. F. **Desenvolvimento preliminar de um biossensor enzimático para determinação de taninos hidrolisáveis**, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro/ UFRJ, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos

Químicos e Bioquímicos, 2008.

MORAN, G. P.; COLEMAN, D. C.; SULLIVAN, D. J. **Candida albicans versus Candida dubliniensis: Why Is C. albicans More Pathogenic?**. *International Journal of Microbiology*, v. 2012, 2011. Article ID 205921, doi: 10.1155/2012/205921.

PETTIT, R. K. et al. **Microplate Alamar Blue Assay for Staphylococcus epidermidis biofilm susceptibility testing**. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 49, p. 2612-2617, 2005.

PETRÔNIO, S. et al. **Atividade Antifúngica de Ácido Gálico e seus Ésteres Semi-sintéticos**, 2009. Disponível em: <<http://sec.s bq.org.br/cdrom/31ra/resumos/T0693-1.pdf>>. Acesso em: 14 de abril 2012.

POLEWSKI, K.; KNIAT, S.; SLAWINSKA, D. **Ácido gálico, um antioxidante natural, em solução aquosa e meio ambiente micelar: estudos espectroscópicos**. Disponível em: <<http://taninos.tripod.com/acidogalico.htm>>. Acesso em: 14 de abril 2012.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. **Microbiology**, 5th ed. McGraw-Hill Companies, 2002, p. 949-950.

RAMAGE, G. et al. **Characteristics of biofilm formation by Candida albicans**. *Revista Iberoamericana de Micologia*, n. 18, p. 163-167, 2001.

RAMAGE, G. et al. **Inhibition of Candida albicans Biofilm Formation by Farnesol, a Quorum-Sensing Molecule**. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 11, p. 5459-5463, 2002.

RÖRIG, K. C. O.; COLACITE, J.; ABEGG, M. A. **Produção de Fatores de Virulência in vitro por Espécies do Gênero Candida**. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 42, n. 2, p. 225-227, 2009.

ROSSO, R. **Avaliação das propriedades antioxidantes de derivados ésteres do ácido gálico**. 2005. Dissertação (Mestrado em Farmácia na área de Concentração: Fármacos e Medicamentos/ Análises Clínicas) – Forianópolis: UFSC, 2005.

SAMPSON, G. **On the use of gallic acid in cases of albuminous urine**. *The Lancet*, v. 54, p. 577 – 578, 1849.

SANTANA, D. P. et al. **Prevalência de Fatores de Virulência de Candida albicans Isoladas da Cavidade Bucal de Crianças Portadoras e Não Portadoras de Síndrome de Down**. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer*, v. 6, n. 11, 2010.

SANTOS, R. I. **Metabolismo Básico e Origem dos Metabólitos Secundários**. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. p. 323-353.

THOMPSON, P. E.; MOORE, A. M.; REINERTSON, J. W.; **Antimalarial activity of α -resorcylic acid and analogs and reversal by p-hydroxybenzoic acid**. *Antibiotics and Chemotherapy*, v. 3, p. 399-408, 1953.

SOBRE OS ORGANIZADORES

NAYARA ARAÚJO CARDOSO Graduada com titulação de Bacharel em Farmácia com formação generalista pelo Instituto Superior de Teologia Aplicada – INTA. Especialista em Farmácia Clínica e Cuidados Farmacêuticos pela Escola Superior da Amazônia – ESAMAZ. Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral. Membro do Laboratório de Fisiologia e Neurociência, da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, no qual desenvolve pesquisas na área de neurofarmacologia, com ênfase em modelos animais de depressão, ansiedade e convulsão. Atualmente é Farmacêutica Assistente Técnica na empresa Farmácia São João, Sobral – Ceará e Farmacêutica Supervisora no Hospital Regional Norte, Sobral – Ceará.

RENAN RHONALTY ROCHA Graduado com titulação de Bacharel em Farmácia com formação generalista pelo Instituto Superior de Teologia Aplicada - INTA. Especialista em Gestão da Assistência Farmacêutica e Gestão de Farmácia Hospitalar pela Universidade Cândido Mendes. Especialista em Análises Clínicas e Toxicológicas pela Faculdade Farias Brito. Especialista em Farmácia Clínica e Cuidados Farmacêuticos pela Escola Superior da Amazônia - ESAMAZ. Especialista em Micropolítica da Gestão e Trabalho em Saúde do Sistema Único de Saúde pela Universidade Federal Fluminense. Farmacêutico da Farmácia Satélite da Emergência da Santa Casa de Sobral, possuindo experiência também em Farmácia Satélite do Centro Cirúrgico. Membro integrante da Comissão de Farmacovigilância da Santa Casa de Misericórdia de Sobral. Farmacêutico proprietário da Farmácia Unifarma em Morrinhos. Foi coordenador da assistência farmacêutica de Morrinhos por dois anos. Mestrando em Biotecnologia pela Universidade Federal do Ceará.

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-7247-126-8



9 788572 471268