

## **Ação antifúngica de extratos e frações de *Annona muricata* L. sobre *Candida* spp.**

### **Antifungal action of extracts and fractions of *Annona muricata* L. on *Candida* spp.**

### **Acción antifúngica de extractos y fracciones de *Annona muricata* L. sobre *Candida* spp.**

Recebido: 11/04/2021 | Revisado: 17/04/2021 | Aceito: 21/04/2021 | Publicado: 07/05/2021

#### **Kellyane Karen Ferreira Aguiar Cesar**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4635-2410>  
Universidade Estadual do Maranhão, Brasil  
E-mail: [kellyanekaren@outlook.com](mailto:kellyanekaren@outlook.com)

#### **Anny Karoline Rodrigues Batista**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9482-6679>  
Universidade Estadual do Maranhão, Brasil  
E-mail: [karol\\_rodrigues.b@hotmail.com](mailto:karol_rodrigues.b@hotmail.com)

#### **Luciana Rocha Paula**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6264-7876>  
Universidade Estadual do Maranhão, Brasil  
E-mail: [lucianapaula\\_99@hotmail.com](mailto:lucianapaula_99@hotmail.com)

#### **Reginara Teixeira da Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5265-1812>  
Universidade Estadual de Londrina, Brasil  
E-mail: [reginara459@hotmail.com](mailto:reginara459@hotmail.com)

#### **Francisco Laurindo da Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6837-4509>  
Universidade Estadual do Maranhão, Brasil  
Email: [flspb@yahoo.com.br](mailto:flspb@yahoo.com.br)

#### **Resumo**

Devido ao amplo potencial medicinal de *Annona muricata*, as pesquisas relacionadas às suas aplicações em diferentes áreas ligadas a saúde são de fundamental importância, principalmente no que se refere a microrganismos infecciosos com tendências a desenvolverem mecanismos de resistência, que é o caso de algumas espécies do gênero *Candida*. Nesse sentido, a pesquisa tem como principal objetivo verificar a ação antifúngica de extratos metanólicos de *Annona muricata* sobre *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e *Candida glabrata*. Os órgãos utilizados para obtenção dos extratos metanólicos foram a folha e o fruto da *Annona muricata*. Para a realização da pesquisa, foram utilizadas cepas ATCC, que foram reativadas e cultivadas em Ágar Saboraud Dextrose. A determinação da atividade antifúngica dos extratos foi realizada pela técnica da difusão em ágar em poços. Na análise dos resultados, os valores de mensuração dos diâmetros dos halos indicaram uma ação mais significativa nos testes realizados com as espécies de *C. krusei* e *C. albicans* frente aos extratos brutos da folha e do fruto de *A. muricata*, com halo de 30 mm e 22 mm, respectivamente. Em relação ao fracionamento químico realizado, os produtos obtidos a partir das frações butanólica e hexânica da folha sobre cepas de *C. krusei*, *C. albicans* e *C. parapsilosis* foram os que apresentaram resultados mais significativos. Dessa forma, comprovou-se que substâncias presentes nesse vegetal podem ser utilizadas no controle cepas de *Candida*, contudo, estudos mais aprofundados são necessários para identificação e isolamento dos compostos biológicos ativos desses vegetais.

**Palavras-chave:** Extratos vegetais; Atividade antimicrobiana, Infecções fúngicas.

#### **Abstract**

Due to the wide medicinal potential of *Annona muricata*, research related to its applications in different areas related to health is of fundamental importance, especially with regard to infectious microorganisms with a tendency to develop resistance mechanisms, which is the case of some species of genus *Candida*. In this sense, the research has as main objective to verify the antifungal action of methanolic extracts of *Annona muricata* on *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*. The organs used to obtain methanolic extracts were the leaf and fruit of *Annona muricata*. For conducting the research, ATCC strains were used, which were reactivated and grown on Saboraud Dextrose Agar. The determination of the antifungal activity of the extracts was carried out using the agar diffusion technique in wells. In the analysis of the results, the measurement values of the diameters of the halos indicated a more significant action in the tests carried out with the species of *C. krusei* and *C. albicans* against the raw extracts of the leaf and the fruit of *A. muricata*, with a halo of 30mm and 22mm respectively. In relation to the chemical fractionation carried out, the products obtained from the butanolic and hexane fractions of the leaf on strains of *C. krusei*, *C. albicans* and *C. parapsilosis* were the ones that presented the most significant results. Thus, it was proved that substances present in this plant can be used to control *Candida* strains, however, further studies are needed to identify and isolate the active biological compounds of these plants.

**Keywords:** Plant extracts; Antimicrobial activity; Fungal infections.

### Resumen

Debido al amplio potencial medicinal de *Annona muricata*, la investigación relacionada con sus aplicaciones en diferentes áreas relacionadas con la salud es de fundamental importancia, especialmente en lo que respecta a los microorganismos infecciosos con tendencia a desarrollar mecanismos de resistencia, como es el caso de algunas especies del género *Candida*. En este sentido, la investigación tiene como objetivo principal verificar la acción antifúngica de extractos metanólicos de *Annona muricata* sobre *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* y *Candida glabrata*. Los órganos utilizados para la obtención de extractos metanólicos fueron la hoja y el fruto de *Annona muricata*. Para la realización de la investigación se utilizaron cepas ATCC, que se reactivaron y cultivaron en Saboraud Dextrose Agar. La determinación de la actividad antifúngica de los extractos se realizó mediante la técnica de difusión en agar en pocillos. En el análisis de los resultados, los valores de medición de los diámetros de los halos indicaron una acción más significativa en los ensayos realizados con las especies de *C. krusei* y *C. albicans* contra los extractos crudos de la hoja y el fruto de *A. muricata*, con un halo de 30 mm y 22 mm respectivamente. En relación al fraccionamiento químico realizado, los productos obtenidos de las fracciones butanólica y hexano de la hoja sobre cepas de *C. krusei*, *C. albicans* y *C. parapsilosis* fueron los que presentaron los resultados más significativos. Así, se comprobó que las sustancias presentes en esta planta pueden usarse para controlar cepas de *Candida*, sin embargo, se necesitan más estudios para identificar y aislar los compuestos biológicos activos de estas plantas.

**Palabras clave:** Extractos de plantas; Actividad antimicrobiana; Infecciones fúngicas.

## 1. Introdução

As infecções fúngicas passaram a ter alta relevância no decorrer dos anos, uma vez que o aumento progressivo e elevadas taxas de morbidade e mortalidade relacionadas a esse problema ganharam amplo destaque no contexto da saúde pública. Entre os fungos infecciosos envolvidos nesses casos, os do gênero *Candida* estão entre os mais recorrentes, embora sejam colonizadores da microbiota normal do corpo humano, podem causar sérios danos em seu contexto infeccioso (Nakamura, et al., 2013).

Infecções causadas por fungos pertencentes ao gênero *Candida* podem provocar uma variedade de manifestações clínicas que se expressam de forma superficial a invasiva, causando desde infecções na pele e mucosas a infecções sistêmicas, levando a disseminação hematogênica da levedura pelo organismo. Nesse gênero, a maior parcela de infecções invasivas é causada pelas espécies *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* (Golombo & Guimarães, 2003; Sardi, et al., 2013; Deorukhkar & Roushani, 2018)

Embora haja drogas sintéticas disponíveis para combater infecções causadas por esses microrganismos, estudos epidemiológicos demonstram a tendência dessas leveduras a adquirirem resistência a antifúngicos normalmente utilizados para o tratamento da infecção (Canuto & Rodero, 2002). Diversos fatores podem estar relacionados ao desenvolvimento desse mecanismo de resistência, incluindo alteração do alvo de droga ou superexpressão, aumento dos transportadores de múltiplas drogas, e ativação de respostas de estresse (Revie, et al., 2018).

Assim, o aumento das espécies resistentes aos fármacos convencionalmente utilizados, bem como as elevadas taxas de mortalidade associadas, demanda a necessidade de desenvolvimento de alternativas terapêuticas mais eficazes. Nessa perspectiva, a utilização de plantas com potencial fitoterápico surge como uma importante ferramenta na indústria farmacêutica, uma vez que podem possuir uma atuação efetiva no embate a microrganismos oportunistas (Vieira & Nascimento, 2017).

Dessa forma, os estudos com extratos vegetais na busca de opção terapêutica no controle de fungos infecciosos têm ganhado amplo destaque, instigando pesquisas com testes de susceptibilidade de fungos de importância clínica a extratos de diferentes espécies vegetais. Em relação às suas propriedades antifúngicas, alguns vegetais já foram descritos, apresentando potenciais relacionados a compostos fenólicos, flavonóides, cumarinas, quinonas, saponinas e xantonas, além de alcalóides, lectinas, polipeptídeos e terpenóides (Martins, et al., 2015).

Os extratos vegetais são preparados em forma líquida ou em pó, obtidos de diferentes partes do vegetal, podendo haver a retirada dos princípios ativos das drogas vegetais por diversas metodologias (Tenório, et al., 2018). Entre os vegetais pesquisados cientificamente para obtenção de informações a respeito de suas ações terapêuticas, a *Annona muricata* L. (graviola) é um alvo emergente nesses estudos, visto que já apresenta potenciais medicinais em testes realizados em estudos anteriores.

A *A. muricata* é uma planta da família Annonaceae amplamente utilizada na medicina tradicional para tratar doenças como diarreia, disenteria, febre, dor, doenças respiratórias e de pele, parasitas internos e externos, infecções bacterianas, hipertensão, inflamação, diabetes e câncer. Seu potencial terapêutico foi comprovado cientificamente, apresentando ação parasiticida, antinevrálgica, adstringente, emética, anticarcinogênica, genotóxica, antireumática, citotóxica, antileishmania e antimicrobiana (Gajalakshmi, et al., 2012; Coria-Téllez, et al., 2018).

Diversos compostos bioativos já foram verificados na *A. muricata*, entre eles, destacam – se acetogeninas, alcaloides e fenóis (Coria-Téllez, 2018). No fruto são encontrados açúcares, taninos, ácido ascórbico (vitamina C), pectinas e vitaminas A (betacaroteno) e do complexo B. Nas folhas, casca e raiz encontram-se acetogeninas e diversos alcalóides como reticulinas, coreximina, coclarina e anomurina (Barata, et al., 2013).

Devido ao seu amplo potencial medicinal, as pesquisas relacionadas as aplicações da *Annona muricata* em diferentes áreas ligadas a saúde são de fundamental importância, principalmente no que se refere a microrganismos infecciosos com tendências a desenvolverem mecanismos de resistência, que é o caso de algumas espécies de *Candida* spp. Dessa forma, o presente artigo tem como objetivo verificar a ação antifúngica de extratos metanólicos de *Annona muricata* sobre *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e *Candida glabrata*.

## 2. Metodologia

O estudo trata – se de uma pesquisa laboratorial com abordagem quali – quantitativa, pois possui condições de realização das análises controladas e dispõe de resultados numéricos que complementam os dados qualitativos obtidos (Schneider, 2017; Pereira, et al., 2018).

### 2.1 Coleta, preparação e identificação do material vegetal

A espécie vegetal foi coletada na localidade Serra do Gavião, especificamente no sítio São Joaquim, com área aproximada de 3,0 hectares, localizado a 25 km de distância da cidade de Teresina - PI, na região Centro-Norte, entre as coordenadas 04°58.54'S, 42°40.52'W. Exemplares do espécime foram coletados e identificados, as exsiccatas encontram-se depositadas no Herbário Aluízio Bittencourt, sob registro HABIT n° 3569.

As folhas e frutos foram retirados do campo em uma porção de aproximadamente 1 kg, quantidade necessária para obtenção dos extratos metanólicos, para utilização nos testes frente as cepas de *Candida* spp.

### 2.2 Obtenção dos extratos

Os extratos foram adquiridos no Laboratório de Química da Faculdade Integral Diferencial (FACID), no qual todo o processo de obtenção se deu de acordo com as normas e recomendações da Farmacopeia Brasileira (2019). Logo após coleta, os espécimes foram postos para secagem à sombra, ficando expostos ao ambiente durante 4 horas por dia. A trituração dos vegetais foi realizada em moinho de facas até a condição de pó. Posteriormente, foi adicionado ao pó solvente metanol, onde ficou em repouso por 21 dias com agitação diária por 30 minutos. Após esse período, o material foi filtrado e depositado em um evaporador rotativo a 40 °C para retirada de todo o solvente. Os órgãos utilizados para obtenção dos extratos foram a folha e o fruto da *Annona muricata*.

### 2.3 Amostras micológicas

Para a realização da pesquisa foram utilizadas cepas ATCC (American Type Culture Collection) adquiridas comercialmente, sendo elas *Candida albicans* (ATCC 76485), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019.), *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Candida tropicalis* (ATCC 13803). As amostras foram reativadas e cultivadas em Ágar Saboraud Dextrose, todo o procedimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Imunologia das Doenças Infecciosas (LAMIDI) do CESC UEMA, onde foram realizados os testes de susceptibilidade aos extratos vegetais.

### 2.4 Preparo dos meios de cultura

As placas para os testes de suscetibilidade foram formadas de duas camadas compostas de ágar-ágar e ágar Muller-Hinton sucessivamente. Para a formação da primeira camada, foram utilizados 10,6 g do ágar diluídos em 300 ml de água destilada, conforme recomendação do fabricante, essa mistura foi agitada suavemente e levada ao bico de Bunsen até dissolução total do meio de cultura. Alíquotas de 15 ml desse meio foram postas em tubos de ensaio e esterilizadas na autoclave em temperatura de 120°C por 15 minutos. Após a esterilização, as alíquotas foram entornadas em placas de Petri, com tamanho de 90 x 15 mm, as quais foram postas em repouso até solidificação do meio de cultura. Na segunda camada, composta de ágar Muller-Hinton, 3,6 g de soluto foi diluído em 300 ml de água destilada. Alíquotas de 13 ml desse meio foram postas em tubos de ensaio e esterilizadas na autoclave à temperatura de 120°C por 15 minutos.

### 2.5 Preparo e inoculação das cepas

Por meio de uma alça de platina esterilizada foi realizada a inoculação das leveduras recentemente repicadas em tubos de ensaio com 1 ml de solução fisiológica a 0,9%, a turbidez da inoculação foi obtida com base na escala 0,5 de Mac Farland (MF).

### 2.6 Preparação das placas para a realização dos testes

Para a preparação das placas para a realização do teste com extratos brutos, 1 ml da suspensão microbiana foi adicionada aos 13 ml de ágar Muller-Hinton, mantido à temperatura de 45 °C no banho-maria. A segunda parte foi entornada sobre a primeira e poços foram confeccionados na segunda camada, mediante a utilização de ponteiras plásticas esterilizadas de 4,0 mm de diâmetros.

### 2.7 Atividade antifúngica dos extratos vegetais pelo método de difusão em ágar

Os ensaios foram realizados em triplicatas com a utilização de cepas ATCC: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e *Candida glabrata*. A determinação da atividade antifúngica dos extratos foi realizada pela técnica da difusão em ágar em poços, segundo Groove e Randall (1955). Como controle positivo foi utilizado o antifúngico fluconazol, seguindo a padronização do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2019), e como controle negativo foi utilizado inóculo de solução fisiológica esterilizada. A concentração do fluconazol como padrão de controle foi de 64 µg/ml (Höfling, et al.,2010), diluído em DMSO.

Nos poços formados na segunda camada foram adicionados 40 µL dos extratos testados, seguindo metodologia semelhante à de Alves et al., (2008). As placas foram incubadas a temperatura de 36 °C em estufa BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) por um período de 48 h. Após período de incubação foi realizada a leitura dos resultados, que ocorreu através da medição do diâmetro dos halos de inibição que foram formados. Os halos de inibição do crescimento microbiano foram medidos em milímetros, com auxílio de uma régua milimetrada, como o teste foi realizado em triplicata para cada espécie fúngica, médias dos halos foram tiradas para posterior análise.

## 2.8 Fracionamento químico dos extratos

Após a comprovação atividade antimicrobiana, os extratos foram submetidos a um processo de partição líquido-líquido com os solventes de polaridades crescentes hexano, butanol e acetato de etila. Esse procedimento foi realizado visando uma semi-purificação das substâncias através de suas polaridades, sendo possível verificar os principais metabólitos secundários presentes no vegetal (Cechinel Filho & Yunes, 1998).

## 2.9 Análise da atividade antimicrobiana frente a diferentes concentrações das frações dos extratos

A determinação da atividade antimicrobiana de extratos em diluição seriada foi realizada segundo a metodologia modificada conforme recomendada pelo CLSI, 2019 com as mesmas cepas de leveduras utilizadas nos testes de difusão em ágar. Os extratos vegetais foram suspensos em Dimetilsulfóxido (DMSO) e diluições seriadas foram realizadas nas concentrações de 1/10, 1/100 e 1/1000. As placas testes foram confeccionadas seguindo metodologia previamente determinada. Em cada orifício da placa teste foi pipetado 40 µL de cada extrato em diluição seriada. Em seguida, as placas foram incubadas a 36 °C por 48 h sem agitação (Alves, et al, 2008). Após o período de incubação foi realizada a leitura dos resultados, que se deu através da medição do diâmetro dos halos de inibição formados.

## 2.10 Análise estatística

As análises foram realizadas por meio dos programas estatísticos Bioestat 5.3 e R 4.0.3 (Ayres, et al., 2007). Os dados obtidos em relação aos valores dos halos dos extratos brutos da folha e do fruto da *Annona muricata* foram submetidos à análise de significância para verificar se houve diferença significativa entre as médias dos valores de cada extrato, para isso foi utilizado o teste Shapiro-Wilk para análise de normalidade dos dados, quando comprovado que os dados não tinham distribuição normal foi aplicado o teste não paramétrico Mann-Whitney com o nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ ).

## 3. Resultados e Discussão

Para a execução da pesquisa foram utilizados extratos brutos e frações da folha e do fruto da *Annona muricata* (graviola) e cepas ATCC de leveduras pertencentes ao gênero *Candida*.

Com base nos resultados obtidos, verificou-se que o extrato da folha da graviola teve ação inibitória de crescimento sobre as cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, enquanto o extrato do fruto manifestou atividade apenas nas espécies *C. albicans* e *C. krusei*. Os valores de mensuração dos diâmetros dos halos foram mais significativos nos testes realizados com as espécies de *C. krusei* e *C. albicans* frente aos extratos brutos da folha e do fruto de *A. muricata*, com halo de 30 mm e 22 mm respectivamente (Tabela 1).

**Tabela 1-** Valores dos halos de inibição dos extratos brutos metanólicos da folha e do fruto de *Annona muricata* frente a cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*. Caxias-Ma, 2021. N=4.

Espécies Fúngicas	Controle	Extratos	
	Fluconazol	Folha	Fruto
<i>Candida albicans</i>	18,00 mm	11,00 mm	22,00 mm
<i>Candida parapsilosis</i>	10,00 mm	12,00 mm	0
<i>Candida krusei</i>	15,00 mm	30,00 mm	12,00 mm
<i>Candida tropicalis</i>	11,00 mm	0	0
p=0,6761*			

P: valor de p (teste Mann-Whitney), (\*): valor de p não significativo. Fonte: Autores.

O diâmetro dos halos de inibição variou entre as espécies de leveduras e também entre os tipos de extratos, sendo importante destacar os halos de suscetibilidade mais significativos nos testes realizados com as espécies de *C. krusei* e *C. albicans*. Frente a esses resultados, os extratos brutos das porções do vegetal utilizados podem ser direcionados a um fracionamento, com a finalidade de individualizar o princípio ativo existente nos extratos com atividade inibitória sobre as cepas de *Candida* spp. sensíveis e que esse princípio ativo possa ser utilizado no tratamento de infecção ocasionada por essas leveduras.

No que se refere à análise estatística aplicada, observou-se que não há uma diferença significativa da ação dos extratos sobre as cepas testadas ( $p > 0,05$ ). Em comparação com aos halos de inibição nos testes com o antifúngico controle, também foi possível verificar uma ação maior em relação ao halo do extrato do fruto em *C. albicans* e ao halo do extrato folha em *C. krusei*, a variação observada na ação do controle perante as cepas pode estar relacionada a concentração utilizada do antifúngico, além de mecanismos de respostas diferenciados de cada espécie.

Estudos destacaram diferenças significativas no comportamento entre espécies distintas de *Candida* spp., estas podem impactar diretamente na sua capacidade de adaptação à resposta do hospedeiro, de disseminação no organismo e de desenvolvimento de mecanismos de resistência aos antifúngicos durante os tratamentos (Papon, et al, 2013; Bitew & Abebaw, 2018; Navarro-Arias, et al., 2019). Nesse sentido, é esperado que esses microrganismos também manifestem comportamentos diferenciados perante estudos fitoquímicos, demonstrando a importância de incluir cada espécie que se deseja obter informações nos estudos relacionados ao gênero.

Substâncias com atividade biológica como fenóis, glicosídeos, antraquinonas, taninos, flavonoides, terpenóides, saponinas, triterpenos estão presentes em alguns indivíduos da família *Anoneaceae* (Simo, et al., 2018). Em relação aos compostos fitoquímicos presentes na *Annona muricata*, os alcalóides, saponinas, taninos, terpenóides e antraquinonas foram verificados em extratos metanólico e aquoso de folhas e frutas do vegetal, que demonstraram ação antifúngica em *Candida albicans* (Vinothini & Growther, 2016). Essa ação também foi observada no presente estudo, no qual verificou-se a formação de halos de *C. albicans* para os dois tipos de extratos metanólicos (folha e fruto).

No estudo de Braga et al (2020), testes com extratos da folha de *Psidium guajava* Linn. foram realizados levando em consideração a polaridade dos extratos, de modo a comparar a resposta das cepas perante os diferentes solventes, sendo eles o metanol (polar), acetato de etila (média polaridade) e hexano (apolar). Cada extrato teve ação sobre as cepas de *Candida*

*albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*, no entanto, somente o extrato metanólico demonstrou significativa atividade antifúngica, sendo um dos solventes mais utilizados nesse tipo de pesquisa.

No que se refere às análises realizadas com as frações obtidas dos extratos brutos anteriormente testados, verificou-se que poucas delas manifestaram ação perante as cepas fúngicas. As frações dos compostos que apresentaram atividade antimicrobiana foram a Fração Butanólica da Folha (BF) em *C. krusei* e a Fração Hexânica da Folha (HF) para as cepas de *C. albicans* e *C. parapsilosis* (Tabela 2).

**Tabela 2-** Ação das frações químicas dos extratos da folha e do fruto da *Annona muricata* frente a cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, Caxias-Ma, 2021. N=06.

Espécies Fúngicas	Extratos Fracionados					
	BF	BFT	AEF	AEFT	HF	HFT
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	10	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-	-	-	-	8	-
<i>Candida krusei</i>	30	-	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	-	-	-	-	-

(-): Sem ação, BF: Butanol Folha, BFT: Butanol Fruto, AEF: Acetato de Etila Folha, AEFT: Acetato de Etila Fruto, HF: Hexano Folha, HFT: Hexano Fruto. Fonte: Autores.

Considerando os resultados obtidos na Tabela 2, observou-se que o princípio ativo de alguns extratos brutos de partes dos vegetais utilizados nos experimentos ainda manteve a atividade antimicrobiana sobre cepas após fracionamento. Esses resultados são muitos promissores quanto à utilização de fracionamentos químicos na individualização do princípio ativo de vários extratos vegetais, necessário ao controle de microrganismos, assim, aumentando a possibilidade da utilização de extratos vegetais em formulações terapêuticas na eliminação de espécies de *Candida* spp associadas a quadros de candidíase em humanos.

Os testes biológicos com as frações possibilitaram uma análise a respeito de quais metabólitos teriam ação sobre determinado microrganismo patogênico. Solventes de polaridades crescentes como o hexano e butanol são utilizados no processo de semi-purificação dos extratos brutos, assim, o fracionamento com essas substâncias tem o intuito de identificar os principais metabólitos secundários presentes na planta. Nesse sentido, os possíveis metabólitos extraídos através da fração BF são flavonoides glicosilados, taninos e saponinas, já na composição HF, estariam presentes esteroides, terpenos e acetofenonas (Filho,1998).

Compostos como rutina, quercetina-3-glicosídeo, quercetina e kaempferol são exemplos de flavonoides presentes na folha da *A. muricata* que integram estudos relacionados aos seus efeitos farmacológicos (YANG et al., 2015). Além desses, sesquiterpenos,  $\delta$ -cadineno,  $\alpha$ -muuroleno, diterpenóide e andrographolide, pertencentes ao grupo de terpenos, também já foram identificados e analisados nesse tipo de pesquisa (Gyesi, et al., 2019).

Estudos fotoquímicos realizados com folhas de *Tapinanthus dodoneifolius* identificaram flavonóides, terpenóides, saponinas e taninos, quando verificado a ação da fração butanólica em *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*, constatou-se halos de inibição apenas em *Candida albicans* (Mohammed, et al, 2019). Extrato com a utilização do

solvente butanol obtidos a partir de folhas de *Annona muricata* também provocou a formação de halos em *C. albicans* nos estudos de Adewale e Similoluwa (2019), contrariando os resultados observados na presente pesquisa (Tabela 1).

Em relação a fração hexânica do extrato de folha de graviola, Rustantil e Fatmawati (2020) verificaram ação dessa fração frente a *Candida albicans* maior que o cetoconazol e a nistatina, com zona de inibição de 23,7 mm. Em outra análise, Oluyegen et al (2019) mostraram que o hexano, e acetato de etila de folhas de graviola inibiram *C. albicans* e *C. tropicalis* em concentrações de 300 mg/ml e 150 mg/ml.

Quanto às diluições realizadas para verificar a partir de qual concentração das frações haveria efeito sobre as leveduras, observou-se que nenhuma espécie fúngica manifestou sensibilidade às diluições 1/10, 1/100 e 1/1000, pois não houve formação de halos. As frações BF e HF da *Annona muricata* provocaram reações em algumas espécies, no entanto, constatou-se que a partir da menor diluição testada (1/10) esses compostos não provocam efeito.

#### 4. Considerações Finais

Os resultados descritos demonstram que os extratos metanólicos da folha e do fruto da *Annona muricata* possuem atividade sobre cepas de *Candida* spp, comprovando que substâncias presentes nesse vegetal têm atividade antifúngica.

Os dados obtidos contribuem significativamente para o conhecimento da capacidade terapêutica do espécime vegetal, uma vez que este já é amplamente utilizado de forma medicinal em outras diversas áreas.

Contudo, observou-se que cepas de *Candida* spp. apresentaram comportamentos diferentes quando aos perfis de suscetibilidade em relação aos testes com extratos brutos e quando fracionados, nesse sentido, testes isolados com cada espécie se mantém necessário, visto que cada cepa dispõe de capacidade de resposta e adaptação diferenciadas. Além disso, estudos mais aprofundados são necessários para identificação e isolamento dos compostos biológicos ativos desses vegetais.

#### Referências

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Farmacopeia Brasileira*. (6ªed.) Vol.1., 2019.
- Adewale, A. S., & Similoluwa, F. A. (2019). The Efficacy of Methanol, Dichloromethane and N-Butanol Extracts of Anonna muricata Leaves on Selected Bacteria And Fungi. *New York Science Journal*, 12(10), 53- 56.
- Ayres, M., Ayres Júnior, M., Ayres, D. L., & Santos, A. D. A. (2007). Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. *Instituto Mamirauá, Belém*, 364.
- Alves, E. G., Vinholis, A. H. C., Casemiro, L. A., Furtado, N. A. J. C., Silva, M. L. A., Cunha, W. R., & Martins, C. H. G. (2008). Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Química nova*, 31(5), 1224-1229.
- Barata, L. E. S., Alencar, A. A. J., Tascone, M., & Tamashiro, J. (2013). Plantas Medicinais Brasileiras. *Annona muricata* L. (Graviola). *Revista Fitos*, 4(1), 132-138.
- Braga, S. B., Cáuper, F. R. M., Corrêa, T. C. F., Nóbrega, G. P. P., & da Silva Soares, G. C. (2020). Teste de susceptibilidade ao extrato de Psidium guajava Linn.(Goiabeira) e teste de produção enzimática sobre leveduras do gênero candida. *Brazilian Journal of Health Review*, 3(5), 14497-14520.
- Bitew, A., & Abebaw, Y. (2018). Vulvovaginal candidiasis: species distribution of Candida and their antifungal susceptibility pattern. *BMC women's health*, 18(1), 1-10.
- Canuto, M. M., & Rodero, F. G. (2002). Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *The Lancet infectious diseases*, 2(9), 550-563.
- Cechinel Filho, V., & Yunes, R. A. (1998). Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química nova*, 21(1), 99-105.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2017) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Standard-Third Edition. CLSI document M60. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Colombo, A. L., & Guimarães, T. (2003). Epidemiologia das infecções hematogênicas por Candida spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(5), 599-607.
- Coria-Téllez, A. V., Montalvo-Gonzalez, E., Yahia, E. M., & Obledo-Vázquez, E. N. (2018). Annona muricata: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of chemistry*, 11(5), 662-691.



- Deorukhkar, S. C., & Roushani, S. (2018). Identification of *Candida* species: conventional methods in the era of molecular diagnosis. *Ann Microbiol Immunol*, 1(1), 1002.
- Gajalakshmi, S., Vijayalakshmi, S., & Devi, R. V. (2012). Phytochemical and pharmacological properties of *Annona muricata*: a review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(2), 3-6.
- Gonçalves, A. L., Alves Filho, A., & Menezes, H. (2005). Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arquivos do Instituto Biológico*, 72(3), 353-358.
- Grove, D. C., & Randall, W. A. (1955). Assay methods of antibiotics.
- Gyesi, J. N., Opoku, R., & Borquaye, L. S. (2019). Chemical composition, total phenolic content, and antioxidant activities of the essential oils of the leaves and fruit pulp of *annona muricata* L.(Soursop) from Ghana. *Biochemistry Research International*, 2019.
- Höfling, J. F., Anibal, P. C., Obando-Pereda, G. A., Peixoto, I. A. T., Furletti, V. F., Foglio, M. A., & Gonçalves, R. B. (2010). Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. *Brazilian Journal of Biology*, 70(4), 1065-1068.
- Martins, N., Barros, L., Henriques, M., Silva, S., & Ferreira, I. C. (2015). In vivo anti-candida activity of phenolic extracts and compounds: Future perspectives focusing on effective clinical interventions. *BioMed research international*, 2015.
- Mohammed, M., Musa, A. M., Garba, M. A., Adeiza, A. A., & Hanwa, U. A. (2014). Phytochemical and antimicrobial study on the leaf extracts of *Erythrophleum africanum* (Caesalpiniaceae). *African Journal of Biotechnology*, 13(4).
- Nakamura, H. M., Caldeira, S. M., Avila, M. A. G. (2013) Incidência de infecções fúngicas em pacientes cirúrgicos: uma abordagem retrospectiva. *Rev SOBECC*, 18(3), 49-58.
- Navarro-Arias, M. J., Hernández-Chávez, M. J., Garcia-Carnero, L. C., Amezcua-Hernández, D. G., Lozoya-Pérez, N. E., Martínez-Duncker, I., & Mora-Montes, H. M. (2019). Differential recognition of *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, and *Candida auris* by human innate immune cells. *Infection and drug resistance*, 12, 783.
- Oluyeye, J. O., Orjiakor, P. I., & Badejo, O. E. (2019). Phytochemical screening and in vitro antimicrobial properties of *Annona muricata* extracts against certain human pathogens. *Zeszyty Naukowe Akademii Morskiej w Szczecinie*, 60 (132), 203–209.
- Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J., & Shitsuka, R. (2018). *Metodologia da pesquisa científica*: UFSM, NTE.
- Papon, N., Courdavault, V., Clastre, M., & Bennett, R. J. (2013). Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. *PLoS Pathog*, 9(9), e1003550.
- Revie, N. M., Iyer, K. R., Robbins, N., & Cowen, L. E. (2018). Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. *Current opinion in microbiology*, 45, 70-76.
- Rodrigues, E. L., Marcelino, G., Silva, G. T., Figueiredo, P. S., Garcez, W. S., Corsino, J., & Freitas, K. D. C. (2019). Nutraceutical and medicinal potential of the *Morus* species in metabolic dysfunctions. *International journal of molecular sciences*, 20(2), 301.
- Rustanti, E., & Fatmawati, Z. (2020). The active compound of soursop leaf extract (*Annona muricata*, L.) as anti-vaginal discharge (Fluor albus). *E&ES*, 456(1), 012071.
- Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., & Giannini, M. M. (2013). *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of medical microbiology*, 62(1), 10-24.
- Schneider, E. M., Fujii, R. A. X., & Corazza, M. J. (2017). Pesquisas quali-quantitativas: contribuições para a pesquisa em ensino de ciências. *Revista Pesquisa Qualitativa*, 5(9), 569-584.
- Simo, M. K., Nguépi, M. D., Sameza, M. L., Toghueo, R. K., Fekam, F. B., & Froidi, G. (2018). Cameroonian medicinal plants belonging to Annonaceae family: radical scavenging and antifungal activities. *Natural product research*, 32(17), 2092-2095.
- Tenório, L. X., Py-Daniel, S. S., Lima, L. A., Oliveira, L. P., Fernandes, T. L., Ghesti, G. F., & da Silva, M. L. (2019). Potenciais Tecnológicos e Patenteabilidade de Tecnologias Derivadas de Extratos Vegetais. *Cadernos de Prospecção*, 12(1), 136.
- Yang, C., Gundala, S. R., Mukkavilli, R., Vangala, S., Reid, M. D., & Aneja, R. (2015). Synergistic interactions among flavonoids and acetogenins in *Graviola* (*Annona muricata*) leaves confer protection against prostate cancer. *Carcinogenesis*, 36(6), 656-665.
- Vieira, F., & Nascimento, T. (2017). *Candida* antifungal resistance and therapeutic approach. *Revista Portuguesa de Farmacoterapia*, 9(3), 29-36.
- Vinothini, R., & Growther, L. (2016). Antimicrobial and phytochemical analyses of methanolic and aqueous extracts of *Annona muricata* (leaf and fruit). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(10), 617-625.