

**EXTRATO ETANÓLICO DE *Combretum laceolatum* Pohl ex
Eichler NO TRATAMENTO DE LARVAS DE *Tenebrio molitor*
INFECTADAS COM *Candida***

Matheus Henrique de Jesus Saraiva ¹
Christian Gabriel da Luz ¹
Yrla Nívea Oliveira Magalhães ²

RESUMO

Do gênero *Candida*, a espécie frequente na microbiota humana é *Candida albicans*, organismo comensal que na maioria das vezes não causa infecção nos indivíduos. Além desta, outras espécies podem causar candidíase, como *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guillierimondii* e *C. lusitaniae*. O principal problema destas espécies é a alta incidência de infecções em adultos associada à elevada mortalidade, decorrente do aumento de microorganismos que apresentam resistência aos antifúngicos. Com a crescente resistência do gênero *Candida* aos antifúngicos disponíveis no mercado surgiu a necessidade de pesquisas em plantas, na busca de compostos de produtos naturais com atividade antifúngica. Dessa maneira, este estudo tem por finalidade avaliar o efeito do extrato etanólico de folhas de *Combretum laceolatum* na infecção letal induzida por espécies de *Candida albicans* em larvas de *T. molitor*, que serão adquiridas comercialmente. O ensaio da infecção de larvas de *T. molitor* terá as seguintes etapas: Padronização do inóculo, Tratamento do extrato etanólico de *Combretum laceolatum* na infecção letal e Quantificação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC's). espera-se com este estudo obter produto que possa ser utilizado contra as infecções de candidíase.

Palavras-chave: Candidíase. *Candida*. *Tenebrio molitor*. Atividade antifúngica.

INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Candida* apresentam estrutura celular característica dos seres vivos do Reino Fungi, que inclui parede celular de quitina e membrana citoplasmática fosfolipídica, constituída por proteínas que agem como enzimas, e o ergosterol. Em condições ótimas de crescimento, com nutrientes específicos e

¹ Estudante do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, IFMA Campus Monte Castelo.

² Profa. Dra. do Departamento de Biologia do IFMA, do Campus Monte Castelo; E-mail:yrlanivea@ifma.edu.br

temperatura ideal, crescem exponencialmente em forma de blastoconídios (MODRZEWSKA; KURNATOWSKI, 2013).

Dos fungos leveduriformes responsáveis por causar doenças em humanos, as espécies pertencentes ao gênero *Candida* aparecem em destaque (SILVA *et al.*, 2012). A espécie *C. albicans* é a mais prevalente em infecções causadas por este gênero. No entanto, o número de relatos de infecções causadas por espécies de *Candida* não-*albicans*, como *C. glabrata* é crescente. O principal problema destas espécies é a alta incidência de infecções em adultos associada à elevada mortalidade, decorrente do aumento de microorganismos que apresentam resistência aos antifúngicos (PFALLER *et al.*, 2010; CASTANHEIRA *et al.*, 2016). As espécies mais comuns que causam vulvovaginites são *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (GONÇALVES *et al.*, 2016).

Candidíase vulvovaginal (CVV) é um nome dado ao quadro infeccioso causado por leveduras do gênero *Candida* e é considerado o segundo tipo de infecção vaginal em mulheres em idade reprodutiva (ZENG *et al.*, 2018)

Estima-se que um terço dos casos de vaginites são de candidíase vulvovaginal, doença caracterizada por sintomas de prurido vulvar, queimação, dor e irritação vulvar, que também podem estar acompanhados de disúria e dispareunia. Pode-se afirmar que até 75% das mulheres têm pelo menos um episódio de candidíase vulvovaginal durante a vida (BARROS, 2020).

A CVV é classificada em não-complicada e complicada. A candidíase complicada caracteriza-se pelo aparecimento de, pelo menos um desses critérios: sintomas intensos, frequência recorrente e agente etiológico não *albicans*. No quadro não-complicado da doença, os sintomas são leves ou moderados, a frequência é esporádica e o agente etiológico é *C. albicans* (SOBEL, 2017).

Alguns fatores podem favorecer o aparecimento de infecções, como por exemplo, gravidez, obesidade, uso de corticoides, antibioticoterapia, uso de contraceptivos, diabetes e imunossupressão, além do risco de infertilidade, doença inflamatória pélvica, gravidez ectópica, aborto, desordem no fluxo menstrual, parto prematuro, candidíase cutânea e congênita e aumento na susceptibilidade de infecção por HIV (BRASIL, 2020).

Atualmente houve um crescimento de leveduras resistentes do gênero *Candida* frente aos antifúngicos disponíveis no mercado. Isto faz com que haja necessidade de pesquisas em plantas, na busca de atividades antifúngicas (ABILIO, 2015).

O uso de plantas para tratamento de forma alternativas de doenças vem sendo uma prática muito comum no decorrer dos anos. Estudos afirmam que os extratos de algumas espécies de plantas possuem componentes antifúngicos que podem ser utilizados no tratamento da CVV.

Nesse contexto, novas abordagens com estudos *in vivo* a partir da utilização de modelos experimentais alternativos têm sido utilizadas nas pesquisas experimentais, com o uso de animais invertebrados como modelo para bioensaios com diferentes finalidades. Entre os invertebrados, as larvas da espécie *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae, Coleoptera) estão entre as mais utilizadas, devido às inúmeras vantagens relacionadas à logística experimental, reprodutibilidade dos testes e possibilidade de controlar as doses a serem utilizadas (KESHAVARZ *et al.*, 2019; 2020).

Dessa maneira, este estudo tem por finalidade avaliar o efeito do extrato etanólico de folhas de *Combretum laceolatum* na infecção letal induzida por espécies de *Candida albicans* em larvas de *T. molitor*.

OBJETIVOS

- Obter o extrato etanólico de *Combretum laceolatum* (pombeiro vermelho).
- Investigar a atividade antifúngica do extrato etanólico de *Combretum laceolatum* (pombeiro vermelho) contra isolados de *Candida spp in vivo*.
- Padronizar a infecção por *Candida* em larvas de *T. molitor*.
- Avaliar o efeito do extrato etanólico de *Combretum laceolatum* (pombeiro vermelho) na sobrevivência de larvas infectadas de *T. molitor* com *Candida*.

METODOLOGIA

Obtenção do extrato etanólico de *Combretum laceolatum*

A preparação do extrato etanólico foi realizada através do método de maceração em etanol/água, pelo período de 10 dias, utilizando álcool etílico a 50%, sendo posteriormente filtrados e armazenados em frasco âmbar. Alíquotas foram secas a 55°C, até obtenção de pellets que foram ressuspensos em 10 ml de DMSO 1%

¹ Estudante do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, IFMA Campus Monte Castelo.

² Profa. Dra. do Departamento de Biologia do IFMA, do Campus Monte Castelo; E-mail: yrlaniveia@ifma.edu.br

(Dimetilsulfóxido 1%), e posteriormente filtradas com microfiltro 22 µm (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

Micro-organismos utilizadas

Foram utilizadas duas amostras de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata* provenientes de secreção vaginal previamente identificadas e estocadas no Laboratório de Biologia do Instituto Federal do Maranhão. Os inóculos foram padronizados na escala 0,5 de McFarland correspondendo a uma concentração de 10⁶ células/mL.

Manutenção das larvas de *T. molitor*

As larvas de *T. molitor* entre 10^o e 12^o estágio larval foram adquiridas comercialmente através de fornecedores especializados na venda de animais invertebrados, e posteriormente mantidas no Laboratório de Biologia do Instituto Federal do Maranhão.

As larvas foram acondicionadas em recipientes plásticos cobertos com tela ao abrigo da luz, contendo ração padronizada a base de farelo de trigo, milho e aveia na proporção de 2:2:2, com temperatura controlada (28.2±5°C) e umidade mantida pela presença de um recipiente com água destilada trocada a cada 48h, de acordo com as metodologias empregadas por Souza *et al.* (2015) e Navarro *et al.* (2019), com adaptações.

Na definição dos grupos teste foram excluídas as larvas que apresentarem alterações em sua cor, falta de resposta ao toque e motilidade lenta. Foram incluídas as larvas com padrões similares de peso, tamanho e aspecto morfológico saudável.

Ensaio da infecção de larvas de *T. molitor*

a) Padronização do inóculo

A padronização dos inóculos foi feita de acordo com a metodologia indicada por Farias (2022).

b) Tratamento do extrato etanólico de *Combretum laceolatum* na infecção letal

Após determinação do inóculo letal (10⁷ UFC/µL), as larvas foram tratadas com concentrações do extrato etanólico de *Combretum laceolatum*, sendo injetado entre o 4^o e 6^o metâmero (5 µL) do inóculo concomitante com as substâncias teste.

c) Quantificação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC's)

Para a quantificação das UFC's nas larvas de *T. molitor* infectadas letalmente com *Candida* foi realizada a maceração do hemocélio em PBS estéril com intervalos de 24, 48 e 72h, correspondendo aos grupos tratados com extrato etanólico de *Combretum lanceolatum* na concentração de 10 mg/Kg e controle negativo. O conteúdo (macerado) foi filtrado e em seguida, foram realizadas diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-7} , sendo transferidos 100 μ L da diluição de 10^{-6} para placas de Petri contendo CHROMagar *Candida* (Kasvi, Italia). Após a secagem, as placas foram incubadas a 37° C por 48 h, seguindo a contagem das colônias formadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Material Vegetal

Os galhos de *Combretum lanceolatum* foram coletados nas seguintes coordenadas geográficas: S 04° 46' 03,5", W 42° 10' 49.9", altitude: 101 m.

Preparação dos extratos

Os galhos de *C. lanceolatum* (505 g) foram secados à temperatura ambiente, moídos em moinho de facas e submetidos à maceração com etanol (95%) por seis vezes consecutivas (com eventuais agitações, deixando em repouso por pelo menos 12 horas antes da retirada do sobrenadante por filtração simples) com intervalos de tempo de 72 horas, sucessivamente. O solvente orgânico foi removido em evaporador rotativo à pressão reduzida em aquecimento entre 40 °C e 50 °C e a água residual por liofilização.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Inicialmente foram feitos testes para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) com linhagens de bactérias (*Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213) e leveduras (*Candida albicans* ATCC 90028 e *Candida krusei* ATCC 6258) de referência para se verificar o potencial de ação do extrato.

A tabela 1 mostra que os valores da CIM do extrato etanólico produzido a partir dos galhos (EECLG) variaram de 3,9 a 125 μ g/m, tendo melhor ação para as leveduras do que para bactérias.

Os valores da CIM para o extrato etanólico produzido a partir das folhas (EECLF) foram maiores, com valores entre 7,8 a 250 μ g/mL, com melhor atividade para *C. albicans*.

¹ Estudante do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, IFMA Campus Monte Castelo.

² Profa. Dra. do Departamento de Biologia do IFMA, do Campus Monte Castelo; E-mail:yrilaniveia@ifma.edu.br

Foram testadas frações preparadas após separação com solventes de diferentes polaridades a partir do EECLG. Destas, as frações aquosa, precipitado e acetato de etila tiveram maior inibição com valor de 125 µg/mL (Tabela 1).

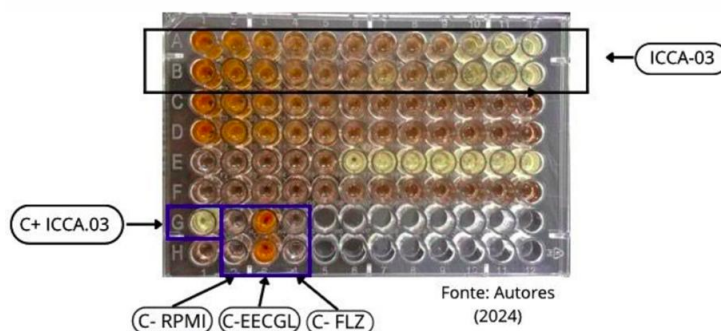
Tabela 1. Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos etanólicos bruto de *Combretum lanceolatum* galhos (EECLG) e folhas (EECLF) e das frações (hexânica - FH; acetato de etila - AcOEt) do extrato dos galhos contra bactérias e leveduras de referência.

Cepas	Extratos µg/mL					
	Extrato etanólico		Frações – extrato etanólico (galhos)			
	EECLG	EECLF	CLG precipitado	CLG aquoso	CLG FH	CLG FAcOEt
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	62.5	250	500	500	250	500
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	125	250	250	250	250	250
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	3.9	7.8	125	125	250	125
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	15.6	250	125	125	250	125

Fonte: Autores (2025)

A figura 1 mostra o ensaio em meio líquido RPMI com uma cepa clínica de *Candida albicans* IC-CA03 extraída de secreção vaginal, e com extrato etanólico de galho de *Combretum lanceolatum* (EECLG) para determinar o CIM. O teste resultou em uma concentração inibitória mínima de 11,7ug/mL.

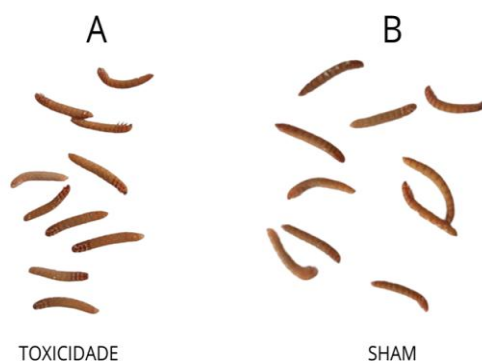
Figura 1. Placa de microdiluição para obtenção do MIC das linhagens.



Fonte: Autores (2025)

A figura 2 mostra as larvas de controle, na qual foi verificado a toxicidade (A) e Sham (B), para que fosse avaliado se o extrato era letal para as larvas mesmo que elas não estivessem inoculadas, e posteriormente verificou-se a SHAM, que é o controle de furo com a seringa, na qual é possível saber se as larvas podem morrer por conta da aplicação da seringa e não pela infecção com o inóculo. Diante disso, após 24 horas, não houve nenhuma baixa, mostrando que, tanto o extrato como a aplicação da seringa, não foram letais para as larvas.

Figura 2. Controle de toxicidade e Sham após 24h.



Fonte: Autores (2025)

Na figura 3 foi possível observar mortalidade entre as larvas, uma vez que elas estavam inoculadas. No entanto, tais baixas ocorreram em apenas 30% delas, pois foi possível observar aspectos como a melanização e a falta de motilidade, comprovando assim que elas não estavam mais vivas, no entanto, após 24 de tratamento, notou-se que tanto o EECLG como o FLZ apresentaram resultados parecidos, pois nas placas, ambas apresentaram 70% de larvas vivas.

¹ Estudante do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, IFMA Campus Monte Castelo.

² Profa. Dra. do Departamento de Biologia do IFMA, do Campus Monte Castelo; E-mail: yrlaniveia@ifma.edu.br

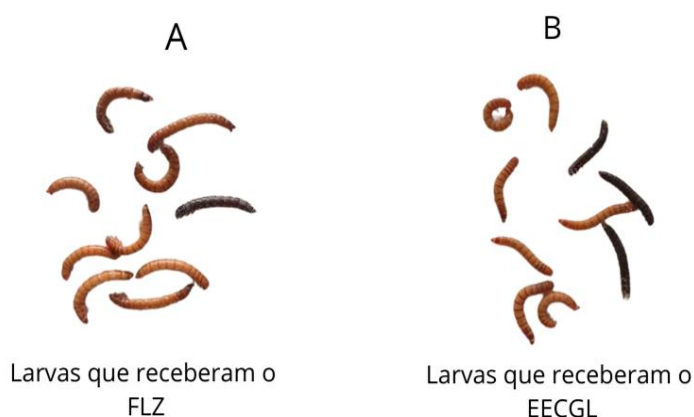
Figura 3. Larvas inoculadas com *C. albicans* IC-CA03 que receberam tratamento com Fluconazol (FLZ) e EECLG após 24h.



Fonte: Autores (2025)

Esses mesmos grupos de larvas, após 48 horas apresentaram o mesmo percentual de sobrevivência, tanto na placa com o EECLG como na placa com o FLZ. A figura 4, mostra que elas ainda mantiveram-se vivas, revelando assim uma boa efetividade do extrato comparado com o FLZ, uma vez que apresentaram resultados semelhantes.

Figura 4. Larvas inoculadas com *C. albicans* IC-CA03 que receberam tratamento com Fluconazol (FLZ) e EECLG após 48h.

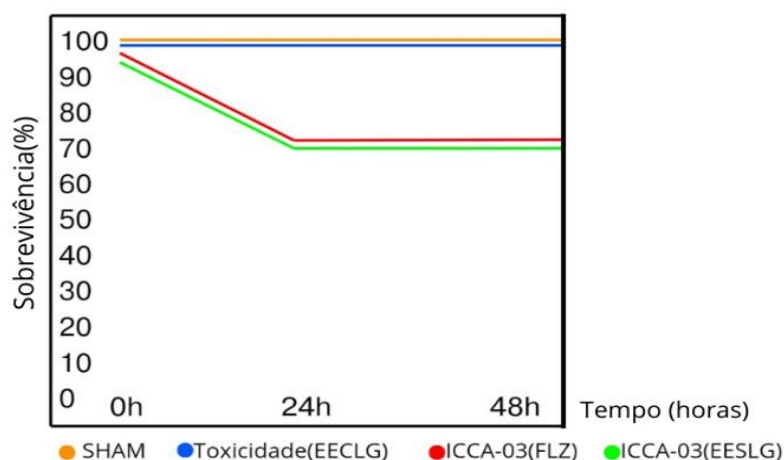


Fonte: Autores (2025)

A figura 5 mostra as linhas de sobrevivência, para os controles de toxicidade e SHAM, e foi possível observar que os dois grupos permaneceram vivos até o fim dos testes de 24h e 48h, como também mostra as linhas de sobrevivência para os grupos que

foram inoculadas com *C. albicans* IC-CA03 e posteriormente receberam tratamento, revelando assim, resultados satisfatórios, uma vez que o extrato que é um meio alternativo para tratamento antifúngico mostrou números semelhantes comparado ao antifúngico padrão

Figura 5. Linhas de sobrevivência dos grupos de controle e dos grupos infectados que receberam tratamento.



Fonte: Autores (2025)

CONCLUSÃO

O EECLG mostrou atividade antifúngica, sem apresentar toxicidade para as larvas e, os resultados obtidos mostraram uma taxa de sobrevivência de 70% nas larvas infectadas com *Candida albicans*, a mesma eficácia do Fluconazol, um antifúngico padrão.

No entanto, o EECGL se destaca como uma alternativa terapêutica promissora, especialmente no contexto da resistência a antifúngicos, uma vez que não há relatos de resistência fúngica ao seu uso. Além disso, sua acessibilidade pode representar uma vantagem significativa em comparação aos tratamentos convencionais.

REFERÊNCIAS

ABÍLIO, V. M. F. *et al.* Atividade antifúngica de produtos naturais indicados por raizeiros para tratamento de candidíase oral. *Rev. Cub. Est.*, v. 51, n. 3, p. 259-269, 2014.

¹ Estudante do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, IFMA Campus Monte Castelo.

² Profa. Dra. do Departamento de Biologia do IFMA, do Campus Monte Castelo; E-mail:yrilaniveia@ifma.edu.br

CAPOTE, A. M. *et al.* Micosis superficiais: casuística del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Caracas, Venezuela (2001-2014). *Investigación Clínica*, v. 57, n. 1, p. 47-58, 2016.

CASTANHEIRA, M. *et al.* Antifungal susceptibility patterns of a global collection of fungal isolates: results of the SENTRY Antifungal Surveillance Program (2013). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 85, p. 200-204, 2016.

CHIBEBE JUNIOR, S. C. P.; TAN, J. J. C.; WANG, F. B. B. Selective photoinactivation of *Candida albicans* in the non-vertebrate host infection model *Galleria mellonella*. *BMC Microbiology*, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2013.

DESALERMOS, A.; FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. Selecting an invertebrate model host for the study of fungal pathogenesis. *PLoS Pathogens*, v. 8, n. 2, p. 100-451, 2012.

FARIAS, J. R. X. *Ximenia americana* L: atividade anti-*Candida* in vitro e in vivo. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão), 2022. 89 p.

FINKEL, J. S.; MITCHELL, A. P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, n. 2, p. 109-118, 2011.

HUANG, M.; KAO, K.C. Population dynamics and the evolution of antifungal drug resistance in *Candida albicans*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 333, p. 85-93, 2012.

KESHAVARZ, M. *et al.* Tm DorX2 positively regulates antimicrobial peptides in *Tenebrio molitor* gut, fat body, and hemocytes in response to bacterial and fungal infection. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1-19, 2019.

KESHAVARZ, M. *et al.* Tm Relish is required for regulating the antimicrobial responses to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in *Tenebrio molitor*. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 1-18, 2020.

LACAZ, C. D. S. *et al.* Tratado de micologia médica. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 44, p. 297-298, 2002.

MATOS, B. M. *et al.* Atividade antifúngica do extrato alcoólico de *Mentha piperita* sobre *Candida albicans* e *C. tropicalis*. *Revista de Odontologia UNESP*, v. 38, n. 4-12, 2009.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao IFMA por ter financiado este trabalho; ao grupo de pesquisa LPBIOTEC, DAB-IFMA-MTC, onde são desenvolvidos os experimentos; ao Laboratório de Produtos Naturais da UFPI, pela parceria.