

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIALIZADA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COORDENAÇÃO DE ENGENHARIA FLORESTAL

NAYANE DA SILVA LIMA

POTENCIAL BACTERICIDA E FUNGICIDA DO EXTRATO PIROLENHOSO DE
Eucalyptus urograndis NAS FORMULAÇÕES EM GEL E SÓLIDO SOBRE
Escherichia coli E *Candida*
albicans

Macaíba - RN
Fevereiro/2022

NAYANE DA SILVA LIMA

POTENCIAL BACTERICIDA E FUNGICIDA DO EXTRATO PIROLENHOSO DE
Eucalyptus urograndis NAS FORMULAÇÕES EM GEL E SÓLIDO SOBRE
Escherichia coli E *Candida*
albicans

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Engenharia
Florestal da Universidade Federal do Rio
Grande do Norte, como requisito parcial
para a obtenção de título de Engenheiro
Florestal.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Santos
Pimenta
Coorientador: MSc. Elias Costa de
Souza

Macaíba - RN
Fevereiro/2022

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Rodolfo Helinski - Escola Agrícola de Jundiá - EAJ -

Lima, Nayane da Silva.

Potencial bactericida e fungicida do extrato pirolenhoso de *Eucalyptus urograndis* nas formulações em gel e sólido sobre *Escherichia coli* e *Candida albicans* / Nayane da Silva Lima. - 2022.

51f.: il.

Monografia (graduação) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias, curso de graduação em Engenharia Florestal. Macaíba, RN, 2022.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Santos Pimenta.

Coorientador: MSc. Elias Costa de Souza.

1. Carbonização da Madeira - Monografia. 2. Infecções - Monografia. 3. Maltodextrina - Monografia. I. Pimenta, Alexandre Santos. II. Souza, Elias Costa de. III. Título.

NAYANE DA SILVA LIMA

POTENCIAL BACTERICIDA E FUNGICIDA DO EXTRATO PIROLENHOSO DE
Eucalyptus urograndis NAS FORMULAÇÕES EM GEL E SÓLIDO SOBRE
Escherichia coli E *Candida*
albicans

Aprovado em:

Prof. Dr. Alexandre Santos Pimenta

MSc. Elias Costa de Souza

Prof. Dra. Tatiane Kelly Barbosa de Azevêdo Carnaval

Macaíba - RN
Fevereiro/2022

A Deus, aos meus pais, familiares e amigos que incansavelmente me apoiaram até aqui, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente, pelas inúmeras oportunidades que Ele me deu na vida. Pela graça de, em meio de tantas batalhas durante esse período, jamais me deixar desistir ou desanimar do meu objetivo.

Aos meus pais, Nilton e Janice, responsáveis inteiramente pelo que sou, minha eterna gratidão! Quantas vezes abdicaram de inúmeras coisas para me verem seguir o caminho que escolhi me proporcionando o melhor sempre, sem deixar faltar absolutamente nada. Obrigada por tudo, eu vos amo de uma maneira inesgotável.

Aos meus avós Afonso, Julia, José e Maria, *in memoriam*. Obrigada por construírem uma família forte, batalhadora, na qual me inspiro dia a dia. Sei que vocês vibrariam comigo a cada conquista, mas estarão presentes pra sempre em meu coração.

A toda a minha família, que me apoia, incentiva e motiva a buscar sempre o melhor, a seguir os meus sonhos.

A todos os meus amigos, que sempre compartilham os melhores momentos da minha vida. Em especial, agradeço por todo companheirismo de Raully, do irmão mais velho que eu sempre quis ter. Você me inspira, me ensina e me faz querer ser melhor. Amo vocês!

A minha irmã de vida e de graduação, Kamilla. Você foi um dos melhores achados em meio do caos que era o primeiro ano de graduação. Obrigada por dividir tantos momentos comigo e me permitir fazer parte da sua família. Amo você e estaremos sempre juntas, uma apoiando a outra, como sempre foi.

Aos meus amigos Abidã, Luan e Rodolpho, eu sou tão grata por ter vocês. Tenho plena certeza que ganhei as melhores pessoas da vida ao meu lado e, ainda, certeza que sem nosso grupo os dias não teriam sido os mesmos, as aulas, os perrengues, as risadas... Obrigada por tudo isso e principalmente por sempre me motivarem. Amo vocês demais!

Aos meus companheiros de turma, aquelas que compartilharam diversas batalhas durante esses 5 anos, meu muito obrigada por fazerem parte dessa etapa da minha vida.

A minha grande amiga e companheira de Laboratório, Yanka. Obrigada por todas as oportunidades, ensinamentos, parcerias. Guardarei tudo no lugar mais especial do meu coração.

Aos amigos que construí durante esses cinco anos, Maria Luíza, Gabriel, Maurício, Isabel e Anderson. Vocês são incríveis! Obrigada pelos cafés, lanches, pelas longas conversas nos horários vagos, por toda a ajuda e por me ensinarem tanto!

Ao meu orientador, Professor Alexandre Pimenta. Obrigada por todo conhecimento, confiança, aprendizados e oportunidades a mim candidas. Inspiro-me em você!

Ao meu coorientador, Elias. Você é uma grande fonte de inspiração! Obrigada por toda ajuda, disposição e comprometimento sempre. Aprendi muito com você!

A todos os professores do Curso de Engenharia Florestal, obrigada por todas as contribuições para a minha formação.

A Escola Agrícola de Jundiá – Universidade Federal do Rio Grande do Norte pelo suporte e todas as oportunidades.

Por fim, a quem possibilitou a realização desse trabalho. Ao Laboratório de Microbiologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Semiárido. Em especial ao Professor Marlon Feijó, Caio Sérgio e Danilo Praxedes. Muito obrigada por todo conhecimento adquirido, por terem sido tão prestativos e comprometidos a me ajudar. Serei sempre grata!

RESUMO

A *Escherichia coli* e a *Candida albicans* são responsáveis por prejudicarem tanto à saúde humana quanto a animal. O método mais utilizado para o tratamento dessas enfermidades é a utilização de antibióticos, porém o uso demasiado causa resistência dos micro-organismos patogênicos. A utilização do extrato pirolenhoso vem sendo uma alternativa bastante empregada. Visando facilitar o transporte, manuseio e aplicação, a utilização de uma nova formulação para o EP, em gel e sólido, é possível a partir da adição de maltodextrina a solução, a fim de suavizar o odor e proporcionar o alcance da viscosidade para as novas fórmulas. Objetivou-se o comportamento e o potencial bactericida e fungicida extrato pirolenhoso em gel e sólido sobre a *Escherichia coli* e a *Candida albicans*, além de estabelecer a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM). Para estabelecer as concentrações a serem utilizadas no teste de microdiluição, foi o realizado o teste de difusão em ágar por disco de poço antecipadamente. Para o teste de microdiluição as concentrações utilizadas foram: Para a *E. coli* com o EP em gel utilizou-se: 15%, 5%, 1%, 0,5%, 0,25% e 0,125% e para o EP sólido: 60, 50, 40, 30, 20, 18, 16, 10 e 1 mg. Para a *C. albicans* com o EP em gel foi utilizado: 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% e 0,25%; e para o EP sólido: 18, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 4 mg. As concentrações foram diluídas e o teste de microdiluição foi montado em duas placas, uma para a bactéria e uma para o fungo. Adicionou-se as concentrações, seguidas dos seus respectivos patógenos. O tratamento controle positivo foi realizado com a adição do meio de cultura correspondente a cada uma delas e o patógeno, já o controle negativo foi utilizado os antibióticos gentamicina e fluconazol. Após o tempo de incubação, as Placas foram analisadas no Leitor de Microplacas e os resultados submetidos a ANOVA um critério, seguido do Teste de Tukey. O EP em gel sobre a *E. coli*, obteve os resultados para CIM e CBM iguais: 1 ml, valor que foi a menor concentração não significativa comparado as outras concentrações. A CIM e CBM do EP sólido para a *E. coli* foi 10 mg/ml e 16 mg/ml, respectivamente. Para o EP em gel sobre a *C. albicans*, a CIM e CFM obtiveram valores iguais, 1 ml. Para o EP sólido a CIM e a CFM também apresentaram resultados iguais: 18 mg/ml para ambas. Portanto, foi possível comprovar a ação antibactericida e antifúngica do extrato pirolenhoso em gel e sólido, nas respectivas concentrações, sobre a *Escherichia Coli* e a *Candida albicans*.

Palavra-chave: Infecções, Carbonização da Madeira, Maltodextrina.

ABSTRACT

Escherichia coli and *Candida albicans* are responsible for harming both human and animal health. The most used method for the treatment of these diseases is the use of antibiotics, but the excessive use causes resistance of pathogenic microorganisms. The use of pyroligneous extract has been a widely used alternative. In order to facilitate the transport, handling and application, the use of a new formulation for the EP, in gel and solid, is possible from the addition of maltodextrin to the solution, in order to soften the odor and provide the viscosity range for the new products. formulas. The behavior and bactericidal and fungicidal potential of pyroligneous extract in gel and solid on *Escherichia coli* and *Candida albicans* were aimed at, in addition to establishing the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Fungicide Concentration (MFC). To establish the concentrations to be used in the microdilution test, the well disk agar diffusion test was performed in advance. For the microdilution test the concentrations used were: For *E. coli* with the EP in gel it was used: 15%, 5%, 1%, 0.5%, 0.25% and 0.125%; and for solid EP: 60, 50, 40, 30, 20, 18, 16, 10 and 1 mg. For *C. albicans* with the EP in gel was used: 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5% and 0.25%; and for solid EP: 18, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 4 mg. The concentrations were diluted and the microdilution test was mounted on two plates, one for the bacteria and one for the fungus. The concentrations were added, followed by their respective pathogens. The positive control treatment was performed with the addition of the culture medium corresponding to each one of them and the pathogen, while the negative control was used with the antibiotics gentamicin and fluconazole. After the incubation time, the Plates were analyzed in the Microplate Reader and the results submitted to one-way ANOVA, followed by the Tukey Test. The EP in gel on *E. coli*, obtained the same results for MIC and MBC: 1 ml, value that was the lowest non-significant concentration compared to the other concentrations. The MIC and MBC of solid EP for *E. coli* were 10 mg/m and 16 mg/ml, respectively. For the EP in gel on *C. albicans*, the MIC and MFC obtained equal values, 1 ml. For solid EP, MIC and MFC also showed the same results: 18 mg/ml for both. Therefore, it was possible to prove the antibacterial and antifungal action of the pyroligneous extract in gel and solid, in the respective concentrations, on *Escherichia Coli* and *Candida albicans*.

Keyword: Infections, Wood carbonization, Maltodextrin.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	OBJETIVOS.....	16
2.2.	Objetivo Geral.....	16
2.3.	Objetivos Específicos.....	16
3.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
3.1.	<i>Escherichia coli</i>	17
3.2.	<i>Candida albicans</i>	18
3.3.	Extrato pirolenhoso.....	20
3.4.	Maltodextrina.....	22
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1.	Processo de obtenção do extrato pirolenhoso.....	23
4.2.	Formulações do extrato pirolenhoso: em gel e sólido.....	25
4.3.	Seleção e preparação da bactéria <i>Escherichia coli</i> e do fungo <i>Candida albicans</i>	27
4.4.	Teste de difusão em ágar por disco de poço.....	27
4.5.	Preparação das concentrações de extrato pirolenhoso em gel e sólido.....	29
4.6.	Teste de microdiluição em caldo.....	32
4.7.	Análise dos dados.....	34
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1.	Teste de difusão em ágar por disco de poço.....	35
5.2.	Teste de microdiluição em caldo.....	39
6.	CONCLUSÃO.....	43
7.	REFERÊNCIAS.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tratamentos do EP em gel para a <i>E. coli</i>	29
Tabela 2. Tratamentos do EP sólido para a <i>E. coli</i>	30
Tabela 3. Concentrações do EP em gel para a <i>C. albicans</i>	31
Tabela 4. Concentrações do EP sólido para a <i>C. albicans</i>	32
Tabela 5. Resultado do teste de difusão em ágar por disco de poço para EP sólido da <i>E. coli</i>	36
Tabela 6. Resultado do teste de difusão em ágar por disco de poço para EP em gel da <i>E. coli</i>	37
Tabela 7. Resultado do teste de difusão em ágar por disco de poço para EP sólido da <i>C. albicans</i>	37
Tabela 8. Resultado do Teste de difusão em ágar por disco de poço para EP em gel da <i>C. albicans</i>	38
Tabela 9. Concentrações e leitura de absorvância para o EP em gel sobre a <i>E. coli</i>	40
Tabela 10. Concentrações e leitura de absorvância para o EP sólido sobre a <i>E. coli</i>	41
Tabela 11. Concentrações e leitura de absorvância para o EP em gel sobre a <i>C. albicans</i>	42
Tabela 12. Concentrações e leitura de absorvância para o EP sólido sobre a <i>C. albicans</i>	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Eucalipto utilizado no processo de carbonização.....	24
Figura 2. Forno usado para a produção de carvão e obtenção do EP.....	24
Figura 3. Extrato pirolenhoso bidestilado.....	24
Figura 4. A. Homogeneização da mistura EP e maltodextrina.....	25
Figura 4. B. Mistura disposta no recipiente.....	25
Figura 5. A e B. Extrato pirolenhoso em gel.....	26
Figura 6. A e B. Extrato pirolenhoso sólido.....	26
Figura 7. Concentrações utilizadas para o teste difusão de poço.....	28
Figura 8. A. Disposição do extrato nos poços da placa.....	29
Figura 8. B. Placa de Petri montada.....	29
Figura 9. Placa utilizada no teste de microdiluição.....	33
Figura 10. Distribuição das concentrações de EP e controle positivo.....	34
Figura 11. A. Halos de inibição da <i>E. coli</i> sobre a ação do EP sólido para as concentrações 1:1 e 1:2.....	35
Figura 11. B. Halos de inibição da <i>E. coli</i> sobre a ação do EP sólido para as concentrações 1:4 e 1:8.....	35
Figura 12. Halos de inibição da <i>E.coli</i> para as concentrações 1:1 e 1:2 do EP em gel.....	37
Figura 13. A. Halos de inibição do crescimento para as maiores concentrações (1:1) do EP sólido para a <i>C. albicans</i>	38
Figura 13. B. Halos de inibição do crescimento para as maiores concentrações (1:2) do EP sólido para a <i>C. albicans</i>	38
Figura 14. A. Halos de inibição de crescimento para as maiores concentrações (1:1) do EP sólido para a <i>C. albicans</i>	39

Figura 14. B. Halos de inibição de crescimento para as maiores concentrações (1:2) do EP sólido para a <i>C. albicans</i>	39
Figura 15. Placa de microdiluição após 24 horas de incubação da <i>E. coli</i> sob a ação do EP em gel e sólido.....	41
Figura 16. Placa de microdiluição após 24 horas de incubação da <i>C. albicans</i> sob a ação do EP em gel e sólido.....	42

1. INTRODUÇÃO

Pertencente à família Enterobacteriaceae, a *Escherichia coli* é uma bactéria que pode ser encontrada no trato intestinal de humanos, bem como mamíferos em geral. A forma de contágio se dá a partir da má cocção dos alimentos contaminados ou através do contato entre pessoa-pessoa por via oral (ANVISA, 2015), assim causando graves infecções. Além de ser considerada uma bactéria de caráter versátil por, por acometer o indivíduos com uma série de infecções, que também podem se estender pela corrente sanguínea, próstata e em locais não intestinais (YAMAMOTO et al., 1997).

A *Candida albicans* é um fungo que reside nas mucosas das cavidades, como na cavidade oral, e também no trato gastrointestinal dos seres humanos e animais (PANIZO, 2011). Possui fácil adaptabilidade ao hospedeiro, podendo adaptar a sua forma, tornando-a mais virulenta e causando doenças cada vez mais resistentes e prejudiciais ao indivíduo (PANIZO, 2011).

As infecções no trato digestório e urinário são as principais doenças originadas através da presença das bactérias e fungos no organismo. As ITU's ou infecções do trato urinário são decorrentes da presença do patógeno nas vias urinárias do indivíduo, colonizando o local (EDUARDO et al., 2011). Essa infecção é caracterizada por ter início na uretra, como uma inflamação, e o que a torna grave é a possibilidade de migração para outros órgãos próximos, agravando o quadro do indivíduo (TORTORA et al, 2005).

O procedimento recomendado para o tratamento de tais enfermidades envolve a utilização de antibióticos, que de forma demasiada ocasiona, primeiramente, o desequilíbrio no organismo do indivíduo, resultando na resistência a utilização do fármaco, onde o desencadeamento da resistência bacteriana é considerado uma ocorrência de origem natural, resultado da pressão seletiva que envolve a grande utilização dos antibióticos, porém vem-se utilizando de forma descontrolada e inadequada e, em alguns casos, criando-se uma correlação entre o grande número de uso do medicamento e os altos níveis de resistência (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

O uso de extratos vegetais vem se tornando uma alternativa de caráter natural, renovável e eficaz contra a ação de bactérias e fungos. Segundo Nascimento et al.

(2000), diversas espécies vegetais estão sendo empregadas por apresentarem características antimicrobianas, devido a sintetização de compostos no mecanismo secundário da espécie. Tais compostos são estimados por suas substâncias ativas, como os compostos fenólicos que compõem os óleos essenciais e os taninos. A versatilidade de sua utilização consiste em: serem produtos com potencial alimentar e como elementos para o controle de fitopatógenos, através da ação fungitóxica ou fígistática, ou ainda a inibição do crescimento micelial e crescimento de esporos (FURLAN, 1998). O extrato pirolenhoso vem sendo empregado em diversas finalidades, dentre elas como fungicida e neomicida (ALVES et al., 2007)

Segundo Maekawa (2002), a utilização do EP é eficiente no tratamento de pragas e doenças, podendo ser utilizado sozinho ou em conjunto com outros extratos. Sendo o extrato pirolenhoso utilizado como antibacteriano e antifúngico, Araújo (2018) avaliou o seu potencial sobre as bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e o fungo *Candida albicans*. Dos problemas que envolvem a utilização do extrato pirolenhoso, destaca-se a sua forma líquida. Ela dificulta, o transporte em larga escala devido seu grande volume, além do risco de desperdício de material durante o trajeto. Além de apresentar odor característico forte e semelhante a defumado (CAMPOS, 2007). Uma alternativa para sanar os problemas no aspecto e odor do extrato pirolenhoso é a adição de maltodextrina a solução.

De acordo com Barroso et al. (2019) uma das vantagens na utilização da maltodextrina é a redução de volume das soluções, beneficiando o armazenamento e transporte para comercialização, por exemplo. Em virtude disso, a obtenção das novas formulações do extrato pirolenhoso é possível através da incorporação da maltodextrina por possuir a propriedade emulsificante, proporcionando à mistura um aspecto viscoso.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Objetivou-se avaliar o comportamento e o potencial bactericida e fungicida do EP em gel e sólido sobre os microrganismos patogênicos.

2.2. Objetivos Específicos

- Estabelecer as concentrações iniciais do EP em gel e sólido para a utilização na bactéria e no fungo;
- Realizar o teste de microdiluição com a utilização do extrato pirolenhoso nas suas formulações para obter as concentrações a serem utilizadas;
- Determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM);
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do EP para a bactéria *Escherichia coli* e o fungo *Candida albicans*.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. *Escherichia coli*

Originária da família Enterobacteriaceae, a bactéria *Escherichia coli* é um bacilo de natureza Gram-negativo, considerada uma espécie com vasta distribuição e comumente encontrada no intestino grosso de humanos e animais de sangue quente (VILA et al., 2016). A *Escherichia coli* foi relatada em 1885 pelo pediatra Theodor Escherich, com sua primeira ocorrência nas fezes de uma criança com diarreia. No ano de 1893 já se tinha conhecimento que a bactéria possuía cepas, umas de origem patogênica e outras não (MAINIL, 2013).

Evolutivamente, a *E. coli* tem sua origem tem sido pesquisada devido a presença de fatores de virulência de acordo com a organização populacional desta bactéria relacionada aos diferentes grupos, a qual define-se através dos métodos filogenéticos (JOHNSON et al., 2007). Tais análises descreveram que as cepas desta bactéria podem ser classificadas em quatro grupos principais para esta espécie: A, B1, B2 e D (CLERMONT et al., 2000). As cepas consideradas virulentas são as classificadas no grupo B2 (HERZER et al., 1990). Ainda, pode ser classificada de acordo com seu patotipo como: enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), extra intestinal (EXPEC), enterro-hemorrágica (EHEC), produtora de toxina Shiga (STEC), uropatogênica (UPEC), e outras como enteropatogênica para suínos (PEPEC); enteropatogênica para coelhos (REDEC) e patogênica para aves (APEC) (GYLES et al., 2011).

A *E. coli* é considerada contaminante comum, coliforme fecal, presente em água e alimentos, onde pode ser utilizada como indicador das qualidade da água para o consumo e uso comum diário. Mesmo após a desinfestação dela no ambiente, ela pode sobreviver ainda por até 11 semanas quando exposta a condições consideradas ideais de temperatura e umidade, tornando-se assim, um patógeno ativo para a infecção de animais suscetíveis ao local em que ela está presente. (GILPIN et al., 2002; AHMED et al., 2007; DHO-MOULIN et al., 1999).

O isolamento da *E. coli* ocorre de forma simples, através da coleta de amostras fecais oriundas do cultivo em meios de cultura exigentes onde a mudança de pH, devido a ocorrência da fermentação da lactose existente no meio, pode distinguir as cepas de consideradas fermentadoras ou não de lactose. Ela consegue em ambientes aeróbicos e anaeróbicos, em temperatura adequada e de preferência 37°C, sendo capaz de se movimentar ou não (CROXEN et al., 2013).

A presença de linhagens no intestino sem causar doenças ou distúrbios, corresponde a grande maioria. Porém algumas linhagens possuem essa capacidade de provocar distúrbios intestinais e extra intestinais nos mais diversos indivíduos (KAPER et al., 2004). Um distúrbio gastrointestinal que pode ser originado a partir do contágio com a *E. coli* é a diarreia. Essa enfermidade é considerada um grave problema que acomete a saúde pública e que tornou alvo crianças menores de cinco anos, chegando levar a óbito (World Health Organization, 2016).

A grande maioria das infecções ocorridas no trato urinário possui como agente etiológico mais comum, a *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC), tornando-se responsável por cerca de 80% de todas as infecções urinárias recorrentes (ULETT et al., 2013). A cultura de utilização de plantas medicinais teve sua origem nos primeiros séculos de existência da humanidade, aplicada de forma relevante e sendo considerada eficaz no tratamento de doenças, apesar de não se conhecer a natureza dos seus constituintes. Desde então, a prática de utilização dos fitoterápicos é uma alternativa bastante utilizada pela população que carrega historicamente essa característica (MACIEL et al., 2002). Vem se tornando crescente a utilização de extratos de origem vegetal e Medeiros (2020) observou o potencial das folhas de *Libidibia férrea*, afirmando sua característica antimicrobiana sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis*.

3.2. *Candida albicans*

As leveduras que compõem o gênero *Candida* são classificadas no Reino Fungi e pertencente a família Candidaceae (CALDERONE, 2002), compreendendo aproximadamente 150 espécies de leveduras que compõem, em sua grande parte, os nichos ecológicos. Grande parte das espécies apresentam características saprofíticas, sendo algumas partes da microbiota humana e, somente 10% destas causam infecções. Elas se reproduzem de forma assexuada através do brotamento (PAPPAS, 2006) e são capazes de crescer em diversos substratos orgânicos e em meios de cultura, como o Ágar Sabouraud, Ágar fubáe Candida CHROMagar®. Essas leveduras possuem temperatura ideal para o crescimento, de 18° a 45°C, e são classificados como mesófilos (KURTZMAN et al., 2010).

O gênero *Candida* é caracterizado por apresentar organismos do tipo eucarióticos, dos quais apresentam parede celular definida, composta por uma camada de polímero de manose, uma camada denominada glucana e de uma pequena quantidade de proteínas e lipídios. A sua membrana possui características que se assemelham a dos mamíferos, possuindo dupla camada fosfolipídica e diversos tipos de esteróis, sendo o ergosterol o principal (AKPAN & MORGAN, 2002).

Derivado do latim, o nome *Candida albicans* é originado a partir do *candidus*, que significa “branco reluzente” e *albicans* que significa “embranquecer”, o pode ser similar ao exsudato branco que se torna visível nas mucosas infectadas (GOW & YADAV, 2017). Responsável por colonizar parte da microbiota humana e colonizar, de forma assintomática, a *C. albicans* atual no trato gastrointestinal, microbiota oral e vaginal, comportando-se de forma comensal. As alterações causadas em decorrência de mecanismos de defesa do hospedeiro podem culminar em conduta patogênica. Esse processo acontece de acordo com a translocação do fungo para a corrente sanguínea do hospedeiro onde pode alcançar os órgãos essenciais, causando enfermidades graves (KUMAMOTO, 2011; PRIETRO et al., 2014).

Comumente identificada em meios clínicos, a *C. albicans* é a espécie mais comum encontrada nesses locais e que é responsável pela causa das infecções hospitalares, além de ser considerada o patógeno fúngico mais predominante em humanos (LOHSE et al., 2018). A *Candida albicans* possui o polimorfismo em suas classificações quanto a sua estrutura, ou seja, ela é capaz de intercalar entre diversas

morfologias, característica essa que é de grande relevância para a patogenicidade do fungo pois é um fator que facilita a penetração no tecido. Ainda, a *C. albicans* possui a capacidade de aderir em diferentes tipos de mucosas e epitélios, possui termotolerância significativa e produz enzimas como proteinases e fosfolipases, esses fatores são influentes para aumentar os níveis de virulência da espécie (SILVA et al., 2002).

A utilização de todos os produtos advindos da natureza é uma atividade milenar da qual o homem sempre a executou. Os produtos eram empregados em diversos fins nas mais diferentes áreas, do nutricional ao farmacêutico, e nas diversas necessidades da época, já que a escassez de insumos para a produção de medicamentos era gigantesca. Utilizavam-se produtos provenientes da natureza, como plantas e a grande maioria das partes que as compõe, fungos, bactérias e diversos organismos do ambiente para a produção de medicamentos fitoterápicos e também para a obtenção de óleos e extratos puros (ARAÚJO E LENON, 2011). O uso de extratos para o tratamento de doenças oriundas através de patógenos antifúngicos vem sendo uma alternativa recorrente, onde Silva et al. (2011) utilizou o extrato das cascas de *Ziziphus joazeiro* Mart. para o tratamento e confirmou que o extrato apresentou potencial antimicrobiano, inibindo *Mycobacterium smegmatis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes*, *Micrococcus luteus* e *Candida albicans*.

3.3 Extrato pirolenhoso

A produção de carvão no Brasil, baseada na tecnologia utilizada, culmina no descarte de diversos componentes químicos que são liberados na atmosfera em forma de gases. Neste caso, a resultante da emissão desses gases chama atenção pela perda de compostos químicos que poderiam ser utilizados como forma de agregar valor (BRITO, 1990).

Os agentes poluidores oriundos do processo de carbonização podem ser identificados como: materiais particulados, gases não condensáveis e compostos orgânicos condensáveis. O material particulado são as cinzas, partículas de carvão e fuligem. Os gases não condensáveis são compostos de CO₂, CO, H₂, e CH₄. Por sua vez, os compostos orgânicos condensáveis são um grupo de compostos químicos agrupados em classes diferentes (PIMENTA et al., 2000). A fumaça é composta por subprodutos

de origem tóxica, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, que possuem impacto negativo na saúde humana por apresentar característica mutagênica e cancerígena (BARCELLOS, 2002; CRISTALE et al., 2008).

Durante o processo de carbonização da madeira, a fumaça expelida na natureza possui potencial poluidor devido à presença dos elementos que a compõem (SILVA et al, 2006). Como forma de reduzir os índices poluidores, a coleta e condensação da fumaça origina o extrato pirolenhoso (EP) que é classificado como um subproduto oriundo diretamente da carbonização da madeira. A utilização do EP bruto, logo após a sua obtenção, não é recomendada e faz-se necessário a realização do processo de destilação a vácuo ou pelo método de decantação, para assim eliminar o alcatrão de sua composição (MIYASAKA et al., 2001). Após esse processo, o EP obtém a seguinte composição: de 80 a 90% de água e de 10 a 20% de compostos orgânicos, dos quais o principal é o ácido acético (MAEKAWA, 2002).

Após o processo de condensação, através do resfriamento do material, os compostos orgânicos originam duas frações: a aquosa, o extrato pirolenhoso, e a oleosa, o alcatrão (QUADROS, 2005; CAMPOS, 2007). O extrato pirolenhoso possui coloração que varia de amarelo claro a marrom avermelhada e é constituído por cerca de 200 compostos químicos, tendo destaque o ácido acético, acetona, metanol e água (ZANETTI et al., 2003; SILVEIRA, 2010). Sua coloração do pode variar de acordo com a temperatura utilizada no processo de obtenção que atua como agente ativador ou inibidor dos componentes bioativos (BROWN et al. 1997).

O processo de obtenção do extrato pirolenhoso é realizado a partir da extração do alcatrão insolúvel da mistura e pode ser realizado através do método de decantação artesanal, onde o material fica em repouso por aproximadamente 100 dias para que as frações sejam separadas. Após esse período, realiza-se a destilação a vácuo para a separação do alcatrão solúvel e assim obter o extrato (SILVEIRA, 2010).

Anteriormente era descartado no ambiente causando poluição e por não se investigar sua utilidade. Porém a crescente dos estudos envolvendo o Extrato Pirolenhoso destaca sua importância contra os fitopatógenos (SOUZA-SILVA et al., 2006). A ação inibitória foi comprovada segundo Donde et al. (2013) onde o extrato pirolenhoso atuou sobre o crescimento micelial do fungo *Phytophthora sp.* De Melo et al. (2007) afirma que, baseado em pesquisas sobre o controle de bactérias, o extrato

pirolenhoso tem sido eficaz no controle da *Pseudomona sp.* Pieta (2017) utilizou extratos pirolenhosos de *Eucalyptus spp* e *Saccharum officinarum L.*, onde observou resultados positivos para a ação antifúngica sobre *Colletotrichum truncatum*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum* *Macrophomina phaseolina*.

3.4 Maltodextrina

Caracterizada como um polímero sacarídeo nutritivo, a Maltodextrina possui um sabor adocicado, tendo sua estrutura composta por unidades de D-glicose, unidas entre si por ligações do tipo α (1-4). Visualmente, possui um aspecto de pó, de cor branca ou também pode ser encontrada como solução resultante da hidrólise parcial dos amidos de milho, batata ou arroz com enzimas confiáveis (FDA, 2003). A Maltodextrina, sendo um produto originado a partir da hidrólise do amido, pode ser caracterizada, assim, pelo grau de hidrólise que é expresso em DE, onde aponta a porcentagem de açúcares redutores calculados como dextrose, tendo como base a matéria seca (MARCHAL et al., 1999; OLIVER et al., 2002).

Segundo Alexander (1992), a DE é responsável por indicar o peso molecular médio dos polímeros de glicose da maltodextrina. De acordo com o avanço do processo de hidrólise, o peso molecular das cadeias de glicose diminui e, conseqüentemente, o valor para DE aumenta. O grau de hidrólise do amido é responsável pela composição do produto final esperado. Ainda, o processo de hidrólise completa é responsável por gerar a dextrose, sendo considerados os dois extremos da metodologia. Assim, são utilizados para referenciar a escala de DE, atribuindo-se para hidrólise o valor zero e para dextrose, cem. Para a Maltodextrina e demais produtos de origem hidrolisada, atribui-se valores intermediários de DE, que representam os graus de quebra do amido. A Maltodextrina possui DE entre 3 e 20.

Para os baixos índices de Maltodextrina para DE encaminham-se para apresentar propriedades semelhantes a do amido, com grandes cadeias lineares de glicose. Já para a Maltodextrina com altos índices de DE, apresentam características similares aos xaropes de glicose, que possuem mais cadeias com baixo peso molecular (KUNTZ, 1997).

A composição dos açúcares da Maltodextrina é responsável por estabelecer as características físicas e biológicas, como a higroscopicidade, fermentabilidade nos produtos de origem alimentícia, viscosidade, estabilidade, doçura, gelatinização, osmolaridade e assimilação pelo organismo. A higroscopicidade é relacionada a habilidade da substância de absorver a umidade do meio em que está inserida. A osmolaridade é classificada como a quantidade de partículas do soluto é dissolvida na solução (MARCHAL et al., 1999).

Das diversas aplicações, a Maltodextrina possui uma vasta utilização no ramo alimentício, químico e farmacêutico, em suas indústrias, onde atua como agente emulsificante; no processo de secagem ou de microencapsulação, devido à alta capacidade de emulsificação, custo reduzido e permite maior estabilidade, retenção de compostos voláteis e redução da higroscopicidade (BARROS et al., 2019). O processo de microencapsulação é responsável por incorporar sólidos, líquidos ou gases em corpos que liberam gradualmente os componentes imobilizados (ABURTO et al., 1998). Além disso, a microencapsulação de alimentos utiliza formulações que contém o ingrediente a ser preservado em combinação com os agentes encapsulantes. Desta forma, a Maltodextrina sendo de característica estável, de baixa higroscopicidade e baixo custo, ela atua como o próprio agente encapsulante, sendo um dos mais utilizados nos processos de microencapsulamento de óleos, devido a sua capacidade antioxidante, da qual preserva o produto (SHAHIDI & HAN, 1993).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Processo de obtenção do extrato pirolenhoso

O processo de obtenção do extrato pirolenhoso foi conduzido na Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias (UEACIA), na Escola Agrícola de Jundaí, pertencente à Universidade Federal do Rio Grande do Norte e localizada no município de Macaíba/RN.

A madeira utilizada no processo de carbonização é oriunda do plantio da própria UEACIA, sendo a espécie híbrida de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (Figura 1), o *Eucalyptus urograndis*. O corte da espécie foi realizado do tipo raso. Para

a queima da madeira é utilizado o forno do tipo retangular, possuindo um queimador do tipo vertical para a fumaça, conforme observado na Figura 2.

Figura 1. Eucalipto utilizado no processo de carbonização e Figura 2. Forno usado para a produção de carvão e obtenção do EP.



Fonte: Autor, 2019.

A temperatura final do processo é de 450° C e perdura por um período de 30 horas consecutivas de queima. Ao final, o extrato pirolenhoso bruto foi encaminhado para o Laboratório de Tecnologia da Madeira da UEACIA onde passou pelo processo de bidestilação, com o auxílio do destilador do tipo retorta inox a fim de obter um líquido de coloração clara (Figura 3).

Figura 3. Extrato pirolenhoso bidestilado.



Fonte: Autor, 2019.

A etapa de bidestilação é fundamental, pois possui a função de eliminar as substâncias tóxicas presentes, deixando o Extrato Pirolenhoso mais puro, aumentando a sua utilização para diversos fins.

4.2. Formulações do extrato pirolenhoso: em gel e sólido

As novas formulações do extrato pirolenhoso, em gel e sólido, foram possíveis através do processo de adição da maltodextrina ao EP. Essa adição foi realizada na proporção de 10%, sendo acrescentados 1200 g de extrato pirolenhoso e 120 g de maltodextrina. Para garantir que a mistura fosse homogeneizada por completo, utilizou-se um agitador magnético (Figura 4 A). Após a adição da maltodextrina, a mistura apresentou coloração amarela clara, a mesma coloração do extrato pirolenhoso e com odor marcante. Após isso, as amostras foram colocadas em recipientes do tipo inox (Figura 4 B) e levadas para estufa de secagem em temperatura constante de 60 ° C.

Figura 4 A. Homogeneização da mistura EP e maltodextrina e Figura 4 B. Mistura disposta no recipiente.



Fonte: Autor, 2021.

O tempo de permanência e a observação contínua das amostras em estufa são responsáveis por atingir o ponto exato das novas formulações. O estabelecimento do tempo de permanência em estufa para ambos os extratos, em gel e sólido, foi baseado em consecutivos pré-testes anteriores, onde o material permaneceu em estufa por 60° C durante 10 horas, 18 horas e 20 horas para o gel, 24 horas, 48 horas e 50 horas para o sólido, a fim de estabelecer o tempo aproximado e para que obtivéssemos o ponto adequado para uso. Portanto, para o extrato pirolenhoso em gel, a amostra permaneceu por 20 horas, até que foi perceptível a viscosidade da mistura e seu aspecto gelatinoso, como pode-se observar nas Figuras 5 A e B, além da coloração marrom, um pouco mais escura, diferente da inicial, e do seu desprendimento quase que total do recipiente. Foi perceptível também a suavização do odor do extrato, se tornando bem mais discreto.

Figuras 5 A e B. Extrato pirolenhoso em gel.



Fonte: Autor, 2021.

Para o extrato pirolenhoso sólido, o material permaneceu em estufa durante um período de 50 horas, onde a amostra solidificou por completo no recipiente. Para o processo de retirada do recipiente, foi necessário o auxílio de espátulas, realizando a retirada e pequenas placas solidificadas e quebradiças (Figura 6 A e B).

Figuras 6 A e B. Extrato pirolenhoso sólido.



Fonte: Autor, 2021.

Assim como na formulação em gel, no sólido a coloração marrom, semelhante à obtida anteriormente. O odor também se manteve suave, não mais marcante, como era inicialmente.

4.3. Seleção e preparação da bactéria *Escherichia coli* e do fungo *Candida albicans*

Esta etapa do experimento foi conduzida no Laboratório de Microbiologia Veterinária – LAMIV da Universidade Federal Rural do Semiárido – UFERSA.

Para testar a funcionalidade do extrato pirolenhoso contra patógenos foi selecionada, de acordo com a disponibilidade existente no laboratório, a bactéria *Escherichia coli* do tipo ATCC 25922, cuja cepa era de origem clínica, e fungo *Candida albicans* do tipo ATCC 10231, para ser utilizados no experimento.

Como método de preparação da bactéria e do fungo, ambas foram replicadas em tubos de ensaio para garantir que pudessem expressar todo o seu potencial durante o processo de avaliação. O meio de cultura, utilizado para a *Escherichia coli* foi o caldo nutritivo BHI - (BHI DIFCO®, Detroit, Michigan, EUA). Já para a *Candida albicans* utilizou-se Agar Sabouraud Dextrose (ASD).

Foi distribuído o meio de cultura referente à bactéria e o fungo em tubos de ensaio novos de forma separada, um para cada espécie. Elas foram retiradas do tubo antigo e postas nos novos tubos com o auxílio da alça de transferência de forma uniforme e realizando movimentos circulares para garantir que todo que estava na alça anteriormente, fosse depositado no novo tubo.

Após serem replicadas, os tubos de vidro contendo a bactéria e o fungo foram postos em estufa do tipo bacteriológica, para o tempo de incubação e crescimento. Esse período difere para as duas espécies. A *Escherichia coli* apresenta crescimento após 24 horas de incubação, já a *Candida albicans* necessita de 48 horas de incubação para desenvolver-se.

4.4. Teste de difusão em ágar por disco de poço

Esse procedimento foi realizado com a função de nortear para o estabelecimento das concentrações que foram utilizadas no teste seguinte, na microdiluição, atuando como um pré-teste dentro do experimento.

Estabeleceram-se inicialmente as concentrações teste a serem utilizadas, ficando assim as mesmas para o extrato pirolenhoso em gel e sólido: 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16 e 1:32. A diluição do extrato se deu de forma seriada, ou seja, para 1:1 utilizou-se apenas o extrato pirolenhoso na quantidade de 100 μ l (Figura 7). Como controle positivo foi utilizado à gentamicina, que é um antibiótico recomendado para o tratamento de infecções da *E. coli* e para a *C. albicans* foi utilizado o fluconazol.

Figura 7. Concentrações utilizadas para o teste difusão de poço.

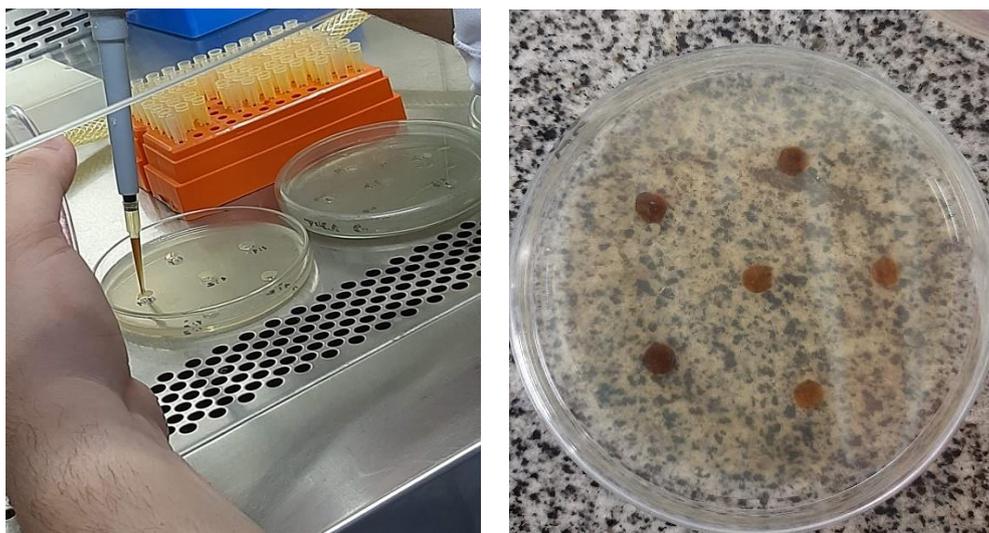


Fonte: Autor, 2021.

A preparação das placas de Petri se deu a partir da aplicação do ágar Mueller-Hinton (MH) por toda a superfície da placa de forma homogênea, criando um local uniforme. Foram postas para descansar por cerca de duas horas, tempo necessário para a solidificação do ágar. Após isso, realizou-se três furos ao centro da placa, cada um contendo 6 mm, com o auxílio de um canudo esterilizado. Fazendo isso para todas as placas.

Após isso, foi adicionado 10 μ l do extrato em cada poço da placa e referente ao seu respectivo tratamento (Figura 8 A e B). Ao final do preenchimento de todas as placas, foram dispostas as bactérias, sendo depositadas com o auxílio de uma alça de transporte.

Figura 8 A. Disposição do extrato nos poços da placa e Figura 8 B. Placa de Petri montada.



Fonte: Autor, 2021.

Ao final, as placas foram para uma estufa do tipo bacteriológica a temperatura de 35 °C, durante um período de 24 horas, que é o tempo correspondente para o crescimento da *E. coli*. Para a *C. albicans* permaneceu por 48 horas.

Após o período de incubação, a formação ou não de halos nas placas foi o parâmetro avaliado. Foi realizada a medição dos halos formados com o auxílio de uma régua milimetrada e analisado os resultados obtidos. Tais resultados foram fundamentais para o estabelecimento de quais faixas de concentrações utilizar para o Teste de microdiluição em caldo.

4.5. Preparação das concentrações de extrato pirolenhoso em gel e sólido

Tendo as novas formulações do extrato pirolenhoso uma forma não líquida, foi necessário realizar a preparação delas a fim de facilitar o manuseio durante a montagem do teste.

As concentrações utilizadas foram diferentes tanto para o gel quanto para o sólido, diferindo também entre as duas espécies utilizadas no experimento.

Para a formulação em gel do extrato pirolenhoso sobre a *E. coli* foram utilizadas as seguintes concentrações: 15%, 5%, 1%, 0,5%, 0,25% e 0,125%, conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Tratamentos do EP em gel para a *E. coli*.

Tratamentos (%)	EP gel <i>E. coli</i> (ml)	Água (ml)
15%	3	7
5%	1	9

1%	0,2	9,8
0,5%	0,1	9,9
0,25%	0,05	9,95
0,125%	0,025	9,97

Desta forma, foi necessário realizar a diluição do extrato em água a fim de torná-lo em um aspecto semelhante ao líquido, facilitando a colocação do tratamento nos poços das placas. O cálculo realizado para a diluição foi executado a partir da regra de três simples, onde: Pegou-se o valor da concentração (15%), multiplicou-se por 2, ficando 30%. Em seguida, multiplicou-se 30% por 10 ml, resultando em 300, valor que foi dividido por 100% logo em seguida, como se pode observar na fórmula abaixo:

$$30\% \text{ para } X; 100\% \text{ para } 10 \text{ ml}$$

$$C_{gel} = 30\% \times 10 \text{ ml} \div 100\%$$

$$C_{gel} = 3 \text{ ml}$$

Onde:

C_{gel} = Concentração utilizada do EP em gel;

30% = valor da concentração utilizado (15%) duplicado;

10 ml = volume total da solução.

Assim, obtendo-se 3 ml para o gel, o complemento para atingir os 10 ml, que é o necessário por tratamento, será adicionado de água, no caso, 7 ml restantes, realizando assim este cálculo para todas as concentrações. A multiplicação realizada com o valor da concentração possibilita que, ao adicionar o meio de cultura referente a cada espécie, o valor fique exatamente o esperado. Caso não houvesse a duplicação do valor da concentração, não seria obtida a concentração de 15%, por exemplo, ela seria dividida ao meio com a adição do meio de cultura, ficando 7,5%, o que não era esperado obter.

As concentrações utilizadas para o extrato pirolenhoso sólido para a *E. coli* foram: 60, 50, 40, 30, 20, 18, 16, 10 e 1. Para saber a quantidade de EP Sólido utilizar, foi realizado o seguinte cálculo: Para atingir o volume total de 3 ml por tratamento, pegou-se o valor da concentração (60), multiplicou-se por três, obtendo o valor do extrato a ser pesado e utilizado. A seguir na Tabela 2, seguem os valores utilizados e suas respectivas concentrações utilizadas.

Tabela 2. Concentrações de EP sólido para a *E. coli*.

Tratamentos	EP sólido <i>E. coli</i> (mg/ml)	Água (ml)
60	180	1,0
50	150	1,0
40	120	1,0
30	90	1,0
20	60	1,0
18	54	1,0
16	48	1,0
10	30	1,0
1	3	1,0

O valor da água para os tratamentos com o sólido foi fixo, utilizando assim 1,0 ml em todos os tratamentos. Para este caso, em específico, foi necessário realizar a maceração do material com o intuito de fragmentá-lo para melhor manuseio nas placas. As concentrações após preparadas e pesadas, foram levadas ao equipamento de banho-maria por poucos minutos a fim de aquecer o extrato pirolenhoso sólido para facilitar sua inserção nos poços.

Para os tratamentos do extrato pirolenhoso em gel com a *C. albicans* foram utilizadas as seguintes concentrações: 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% e 0,25%. Além dos valores das concentrações, os valores para o extrato em gel e a quantidade de água estão descritos abaixo na tabela 3.

Tabela 3. Concentrações do EP em gel para a *C. albicans*.

Tratamentos	EP gel <i>C. albicans</i> (ml)	Água (ml)
4%	0,8	9,2
3%	0,6	9,4
2%	0,4	9,6
1%	0,2	9,8
0,5%	0,1	9,9
0,25%	0,05	9,95

O cálculo para a obtenção do valor do extrato em gel da *C. albicans* foi o mesmo utilizado para a o extrato em gel da *E. coli* descrito anteriormente. Multiplicou-se o valor da concentração para saber o valor do EP em gel que seria utilizado. O resultado

da essa multiplicação foi subtraído de 10 ml, conseguindo o valor de água utilizado para cada tratamento.

As concentrações utilizadas para o extrato sólido da *C. albicans* foram: 18, 16, 14, 12, 10, 8, 6 e 4. Os valores do EP e de água estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Concentrações de EP sólido para a *C. albicans*.

Tratamentos	EP sólido <i>C. albicans</i> (mg/ml)	Água (ml)
18	54	1,0
16	48	1,0
14	42	1,0
12	36	1,0
10	30	1,0
8	24	1,0
6	18	1,0
4	12	1,0

Assim como o cálculo realizado para a *E. coli*, para a *C. albicans* foi realizado o procedimento seguindo os mesmos processos.

Após a etapa de pesagem e preparação, os tratamentos do EP Sólido também foram encaminhados para o Banho-Maria.

O controle positivo foi realizado a partir da adição de antibióticos + meio de cultura correspondente + inóculo (bactéria ou fungo). Para a *E. coli* foi utilizado a gentamicina e para a *C. albicans* o fluconazol, ambos nas concentrações de: 1024 mg/ml; 512 mg/ml; 256 mg/ml; 128 mg/ml; 64 mg/ml; 32 mg/ml; 16 mg/ml; 8 mg/ml; 4 mg/ml; 2 mg/ml e 1 mg/ml. O controle foi disposto em uma placa destinada apenas para ele.

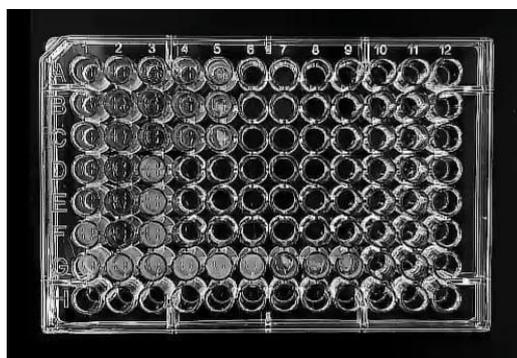
O controle negativo se deu pela adição do meio de cultura, respectivo para cada patógeno, seguido da adição do inóculo correspondente. Preenchendo, de forma a facilitar a leitura dos resultados, a última linha da placa após a adição de todos os tratamentos.

4.6. Teste de microdiluição em caldo

O teste de microdiluição proporciona o estabelecimento da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM).

Para a realização do teste de microdiluição é necessário do auxílio de placas estéreis do tipo Elisa, cada uma contendo 96 poços (Figura 9), contendo 8 linhas (de A a H) e 12 colunas. Desta forma, os tratamentos foram dispostos em forma de triplicata. Para a montagem do teste foram utilizadas duas placas, uma para a bactéria e uma para o fungo.

Figura 9. Placa utilizada no teste de microdiluição.



Fonte: Autor, 2021.

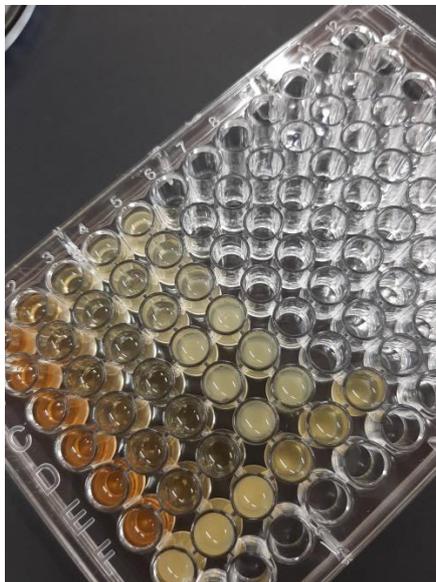
Recomenda-se que a disposição dos tratamentos na placa seja de forma organizada, sempre seguindo uma sequência coerente para que as triplicatas fiquem próximas, facilitando a análise visual ao final do teste.

A montagem do teste foi realizada da seguinte maneira: Para o tratamento controle, adicionou-se com o auxílio de uma pipeta volumétrica a quantidade de 90 μL do meio de cultura correspondente a *E. coli* e *C. albicans* (BHI e Sabouraud, respectivamente) nos poços das suas determinadas placas. Após a adição do meio de cultura, foi acrescentando 10 μL do inóculo, com o auxílio de uma alça transportadora, (bactéria e fungo) em cada poço, assim totalizando 100 μL por unidade de poço, e fechando o tratamento controle do experimento. Para ficarem de forma organizada, os tratamentos controle da bactéria e do fungo ficaram sempre nas últimas fileiras das placas.

As concentrações foram adicionadas, em triplicadas, no processo semelhante ao do tratamento controle. Foram retiradas 90 μL de cada tratamento utilizado e

adicionados 10 μL do inóculo (*E. coli* ou *C. albicans*) para o preenchimento dos poços de suas respectivas placas, como pode ser visto na Figura 10.

Figura 10. Distribuição das concentrações de EP e controle positivo.



Fonte: Autor, 2021.

Após o preenchimento das placas com todos os tratamentos selecionados e com o tratamento controle, elas foram envolvidas com papel alumínio e direcionadas a estufa do tipo bacteriológica para o tempo de incubação. Para a *Escherichia coli*, o tempo de incubação é de 24 horas. Já para a *Candida albicans* necessita de 48 horas para a visualização de resultados quanto ao seu crescimento ou não. Realiza-se após a montagem do teste a primeira (leitura de 0 hora) com o auxílio do Leitor de Microplacas.

Passado o período de incubação, as placas foram lidas a fim de estabelecer a segunda leitura (24 horas/48 horas) que possibilita realizar a leitura da absorbância dos tratamentos e também analisar a olho nu, através da comparação da turbidez dos tratamentos. Os resultados foram colhidos, tabulados e analisados a partir da comparação visual e da média das absorbâncias das triplicatas por tratamento.

4.7 Análise dos dados

Os resultados das médias das triplicatas após a leitura de absorbância foram submetidos ao teste de média, a fim de obter a concentração que apresentou caráter

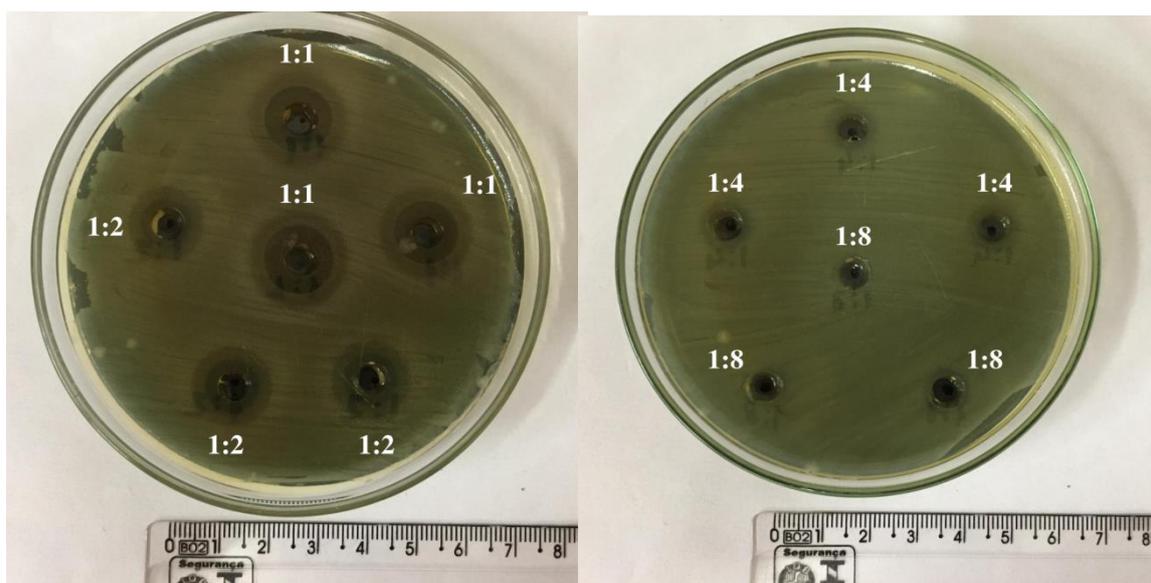
significativo e inibiu o crescimento do patógeno e, conseqüentemente, o estabelecimento da CIM, CBM e CFM. Com o auxílio da ferramenta BioEstat 5.0, foi aplicado a ANOVA um critério seguido do teste de Tukey, considerando apenas os valores que não apresentaram diferença estatística e $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teste de difusão em ágar por disco de poço

Nos ensaios realizados a partir do teste de difusão de Poço, os resultados para a ação antibactericida do extrato pirolenhoso sólido para a *Escherichia coli* podem ser observados nas Figuras 11 A e B, onde se observa a presença de halos de inibição do crescimento bacteriano para os tratamentos 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8.

Figuras 11 A e B. Halos de inibição da *E. coli* sobre a ação do EP sólido para as concentrações 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8.



Fonte: Autor, 2021.

Pode-se observar na Tabela 5 os valores dos diâmetros dos halos obtidos. Os tratamentos alcançaram valores médios para os halos de: 1:1 – 23 mm; 1:2 – 19 mm; 1:4 – 11,3 mm e 1:8 – 3 mm. Para os tratamentos 1:16 e 1:32, não houve a formação de halos, tendo um valor igual a 0, afirmando que a utilização do EP sólido foi eficaz e não houve crescimento do patógeno. Jankowsky (2018) afirma que o extrato

pirolenhoso é eficaz contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, que é o caso da *E. coli*, através de sua fração metanólica, ou seja, altamente solúvel em metanol.

Tabela 5. Resultado do Teste de Difusão em ágar por disco de poço para EP sólido da *E. coli*.

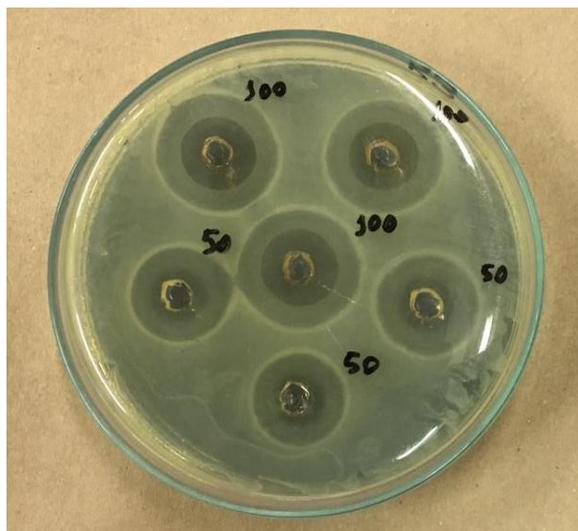
Concentrações	Diâmetro do Halo (mm)					
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
1º Repetição	22	19	12	9	0	0
2º Repetição	24	19	11	0	0	0
3º Repetição	23	19	11	0	0	0

Os resultados do extrato pirolenhoso em gel para a *Escherichia coli* foram semelhantes aos obtidos do Sólido. As concentrações que tiveram a formação de halos de inibição foram as seguintes (Tabela 6), com suas respectivas médias: 100% – 14,6 mm; 50% – 9,6 e 25% – 8,6 mm. As duas maiores médias para os halos de inibição estão exemplificadas na Figura 12. Os tratamentos mais baixos de 12,5 %, 6,25 % e 3,125 % não demonstraram desenvolvimento de halo nas placas. Tais diferenças nos tratamentos podem ser levadas em conta a partir da afirmação de Simões et al. (2007), na qual é possível existência de variações na composição dos extratos devido a condição das partes em que foram coletadas para uso, utilizando por exemplo, as folhas, frutos, cascas, raízes e partes do tronco.

Tabela 6. Resultado do Teste de difusão em ágar por disco de poço para EP em gel da *E. coli*.

Concentrações	Diâmetro do Halo (mm)					
	100%	50%	25%	12,5%	6,25%	3,125%
1º Repetição	14	10	9	0	0	0
2º Repetição	15	9	8	0	0	0
3º Repetição	15	10	9	0	0	0

Figura 12. Halos de inibição da *E.coli* para as concentrações 1:1 e 1:2 do EP em gel.



Fonte: Autor, 2021.

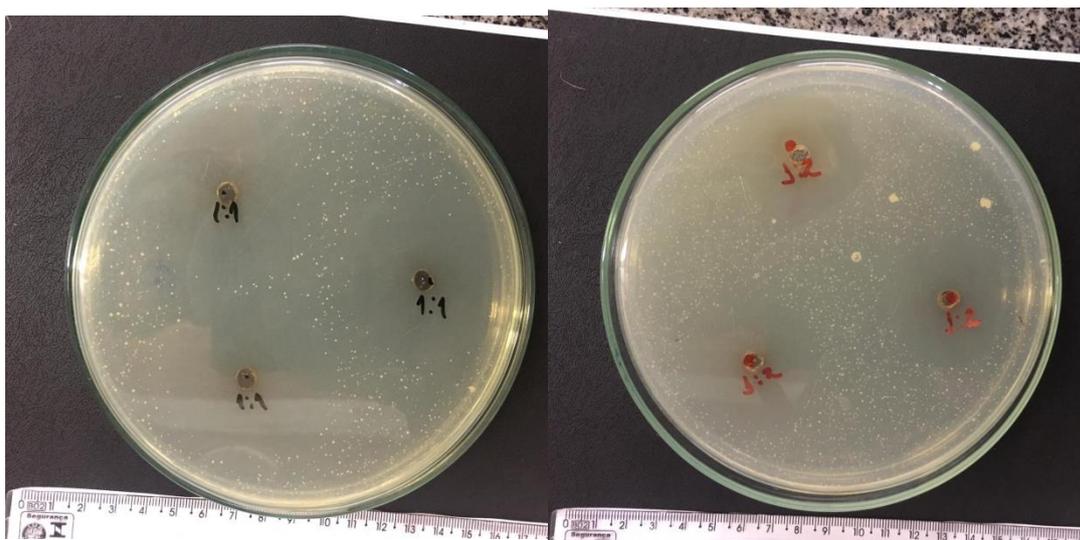
O controle positivo utilizado para a *E. coli* com o EP sólido e em gel obteve média de 30,6 mm para os halos de inibição, sendo esse valor superior aos obtidos com as concentrações do EP. Bacarro et al. (2002) relata que dentre as amostras de *E. coli* analisadas, 85% delas foram resistentes a gentamicina. Os níveis elevados para a resistência podem ser relacionados com a multirresistência, considerada um fenômeno superior a atividade bacteriana (BONGERS et al., 1995).

Para o teste de difusão de poços realizado para a *Candida albicans* sob o efeito do EP sólido, observa-se os valores obtidos a partir das triplicatas na Tabela 7, onde a média de halos de inibição para as maiores concentrações (Figuras 13 A e B) foram de 1:1 – 40 mm; 1:2 – 31 mm; 1:4 – 17,3 mm. Para as concentrações menores foram obtidos: 1:8 – 15,6 mm; 1:16 – 15 mm e 1:32 – 9,6 mm.

Tabela 7. Resultado do teste de difusão em ágar por disco de poço para EP sólido da *C. albicans*.

Concentrações	Diâmetro do Halo (mm)					
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
1º Repetição	45	32	18	15	14	11
2º Repetição	42	30	21	17	18	9
3º Repetição	33	31	13	15	13	9

Figuras 13 A e B. Halos de inibição do crescimento para as maiores concentrações (1:1 e 1:2) do EP sólido para a *C. albicans*.



Fonte: Autor, 2021.

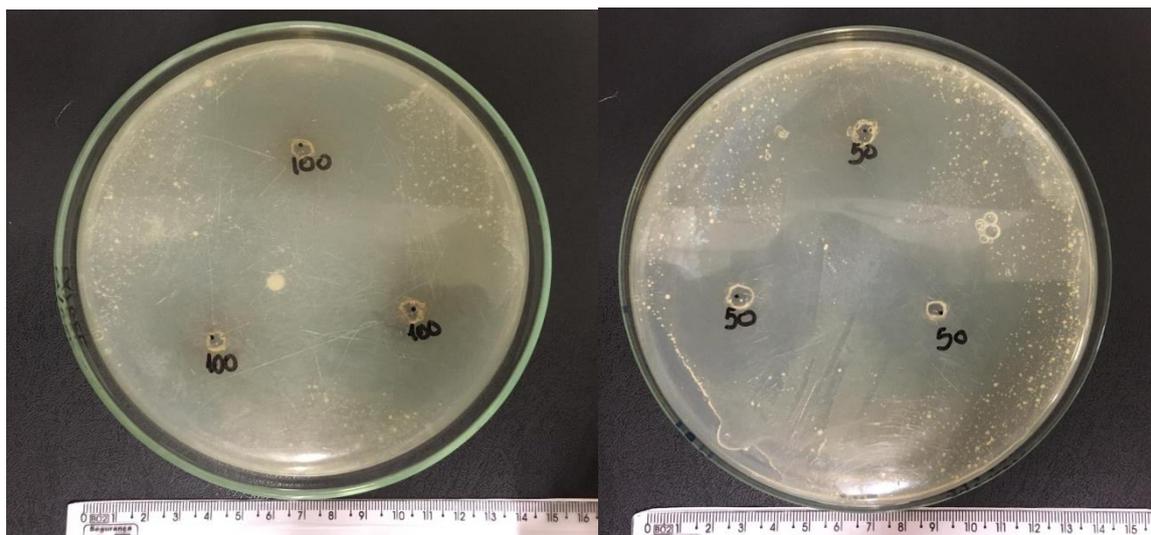
Para o EP em gel da *C. albicans*, as médias de inibição de crescimento foram semelhantes às obtidas pelo EP sólido. A Tabela 8 expõe os valores obtidos e para as médias elas apresentaram os valores: 1:1 – 49,3 mm; 1:2 – 39 mm; 1:4 – 23,3 mm; 1:8 – 20 mm; 1:16 – 15, 6 mm e 1:32 – 12,3 mm. Pode-se observar nas Figuras 14 A e B a semelhança na formação dos halos para as maiores concentrações. O controle positivo da *C. albicans* utilizado tanto para o EP em gel e sólido apresentou média igual a 11,3 mm.

Tais valores, tanto para ação do EP quanto para a ação do antibiótico demonstram um comportamento de resistência do fungo. Arthington-skaggs (2008) comenta que a resistência microbiana ocorre a partir de inúmeras mutações pelo patógeno após a introdução do antifúngico, onde se tornam mais resistentes.

Tabela 8. Resultado do teste de difusão em ágar por disco de poço para EP em gel da *C. albicans*.

Concentrações	Diâmetro do Halo (mm)					
	100%	50%	25%	12,5%	6,25%	3,125%
1º Repetição	50	42	28	23	17	12
2º Repetição	49	35	21	17	15	13
3º Repetição	49	40	21	20	15	12

Figura 14 A e B. Halos de inibição de crescimento para as maiores concentrações (1:1 e 1:2) do EP sólido para a *C. albicans*.



Fonte: Autor, 2021.

Pode-se observar uma relação diretamente proporcional, à medida que as concentrações diminuem a formação de halos de inibição também, mas não garantiram a inibição total de crescimento dos halos. De Souza et al (2004) analisou cerca de 18 extratos de plantas e não obteve êxito para a inibição da *Escherichia coli* e da *Candida albicans*. No caso da *C. albicans*, em específico, sua resistência pode origem na descendência clonal (VIEIRA et al., 2017).

Desta forma, como o objetivo da realização do teste de difusão em ágar por disco de poço como um pré-teste para o estabelecimento da margem de quais concentrações seriam utilizadas no teste de microdiluição em caldo, pode-se concluir que, a maior concentração não é recomendada, 1:1 ou 100 do extrato pirolenhoso em suas novas formulações. Essa concentração não seria eficaz, pois ocorreu o maior crescimento dos halos e, conseqüentemente, de suas médias. Isso mostra que, o EP não demonstrou seu efeito antibactericida e antifúngico. Por outro lado, exclusivamente para a *C. albicans* pode-se recomendar a utilização de menores concentrações a fim de observar o comportamento do EP, se ocorrerá a total inibição.

5.2 Teste de microdiluição em caldo

Os resultados do teste de microdiluição em caldo para a ação antibactericida e antifúngica do extrato pirolenhoso em gel e sólido sobre a *Escherichia coli* e a *Candida*

albicans e, conseqüentemente a CIM, CBM e CFM obtidos após as leituras realizadas, podem ser observados nas tabelas abaixo.

Observou-se que resultado da leitura de absorvância obtido para o EP em gel da CIM para a *E. coli* que foi 1 ml, o menor valor dentre os resultados dos tratamentos que não obteve diferença estatística. Ainda, para o resultado da CBM, também foi equivalente a 1 ml, ficando a CIM igual a CBM.

Sartoratto et al. (2012) estabeleceu uma classificação para a atividade antibacteriana: valores entre 50-500 µg/mL são consideradas fortes; 600-1500 µg/ml como atividade moderada e acima de 1500 µg/ml como uma fraca atividade antibacteriana. Maciel (2020) utilizando o extrato pirolenhoso de eucalipto, observou a redução gradativa o crescimento micelial à medida que as doses de EP aumentaram.

Os valores das médias das triplicatas, seguido do resultado de absorvância para o EP em gel, estão descritos na Tabela 9. Os tratamentos 15 ml, 5 ml, 0,5 ml e 0,25 ml obtiveram diferenças estatísticas, ambos apresentando um valor de $p < 0,05$, dos quais não puderam ser utilizados como resultado.

Tabela 9. Concentrações e leitura de absorvância para o EP em gel sobre a *E. coli*.

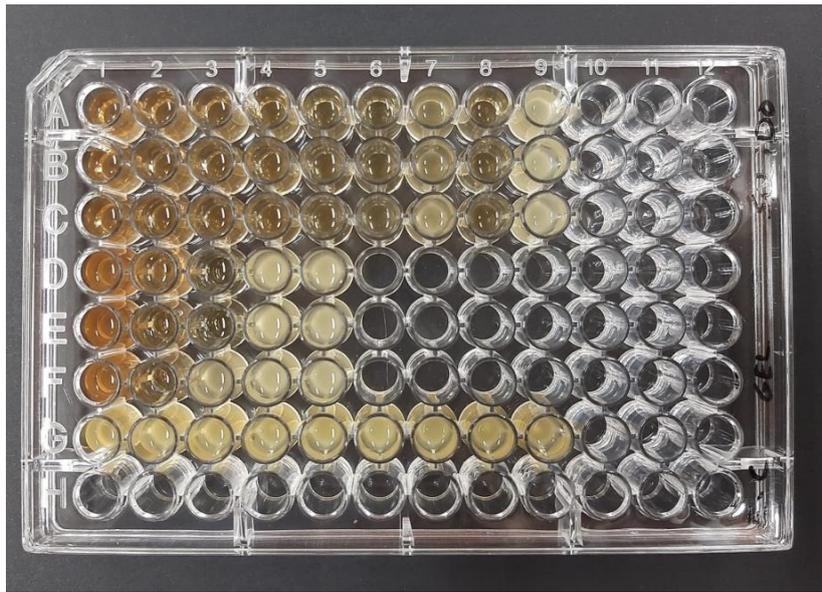
EP em gel para <i>E. coli</i>		
Concentrações	Médias das triplicatas	
	0 hora	24 horas
15 ml	0,619	0,796*
5 ml	0,231	0,229*
1 ml	0,080	0,329
0,5 ml	0,089	1,130*
0,25 ml	0,119	1.064*

*Valores que diferiram estatisticamente, tendo $p < 0,05$.

Fazendo a análise visual da placa de microdiluição, tais resultados são confirmados. Os poços referentes ao tratamento de 1 ml não apresentaram turbidez, reforçando que a CIM e CBM são equivalentes ao tratamento de 1 ml para o EP em gel. Em contrapartida, nos demais poços que compõe os tratamentos, a turbidez é nítida (Figura 15). Vale ressaltar que os tratamentos estão dispostos em decrescente, da coluna 1 a 9.

Figura 15. Placa de microdiluição após 24 horas de incubação da *E. coli* sob a ação do EP em gel e

sólido.



Fonte: Autor, 2021.

Os valores obtidos de CIM e CBM para o EP em sólido sobre a ação da *E. coli* foram: Para a CIM, a mais baixa concentração do extrato que atuou como antibacterida foi 10 mg/ml, como pode ser observado na Tabela 10. Valor esse que se confirma na análise visual da placa, ficando evidente nos poços 8A, 8B e 8C. Para a CBM deste tratamento, o valor pioneiro que apresentou índices de inibição do crescimento da bactéria foi o tratamento de 16 mg/ml, que também é confirmado pela análise visual.

Os valores obtidos para CIM do EP sólido foi semelhante ao que Costa et al. (2013) obteve, sendo o valor de 12,5 mg/l para a *E.coli*.

Tabela 10. Concentrações e leitura de absorbância para o EP sólido sobre a *E. coli*.

EP sólido para <i>E. coli</i>		
Concentrações	Médias das triplicatas	
	0 hora	24 horas
60 mg/ml	0,355	0,317*
50 mg/ml	0,281	0,261*
40 mg/ml	0,223	0,148*
30 mg/ml	0,223	0,226*
20 mg/ml	0,165	0,155*
18 mg/ml	0,139	0,155*
16 mg/ml	0,138	0,606*
10 mg/ml	0,149	0,172
1 mg/ml	0,113	1.038*

*Valores que diferiram estatisticamente, tendo $p < 0,05$.

Para a gentamicina, o controle positivo utilizado para a *E. coli*, a CIM obtida foi equivalente à concentração de 1024 mg/ml, tornando-se superior a obtida pelo extrato pirolenhoso em gel e sólido no tratamento da *Escherichia coli*. Santos (2019) relatou que o estudo da atividade microbiana para as cepas *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, foi observado que a gentamicina não apresentou atividade microbiana, obtendo CIM $\geq 1.024 \mu\text{g mL}^{-1}$, considerado um valor irrelevante.

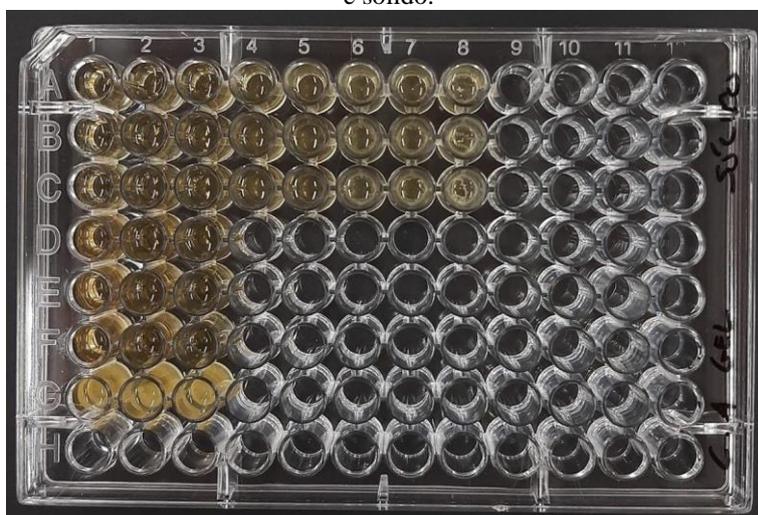
A ação antifúngica do EP em gel para a *C. albicans*, dos quais os valores estão expressos na Tabela 11 e demonstrados na Figura 16, foi obtido para CIM e CFM o mesmo valor para ambas. O tratamento com 1 ml do extrato em gel, demonstrou eficácia para a CIM, por ter sido a menor concentração que atuou como inibitória, além de demonstrar o seu potencial contra a ação fungo. Os demais tratamentos apresentaram diferenças estatística tendo o valor de $p < 0,05$ para as concentrações 4 ml, 3 ml e 2 ml, e $p < 0,01$ para 0,5 ml e 0,25 ml.

Tabela 11. Concentrações e leitura de absorvância para o EP em gel sobre a *C. albicans*.

EP em gel para <i>C. albicans</i>		
Concentrações	Médias das triplicatas	
	0 hora	24 horas
4 ml	0,181	0,234*
3 ml	0,148	0,197*
2 ml	0,103	0,155*
1 ml	0,168	0,222
0,5 ml	0,159	0,345*
0,25 ml	0,142	1,136*

*Valores que diferiram estatisticamente, tendo $p < 0,05$.

Figura 16. Placa de microdiluição após 24 horas de incubação da *C. albicans* sob a ação do EP em gel e sólido.



Para a ação do EP sólido para a *C. albicans* foi obtido para CIM e CFM o valor de 18 mg/ml, como observado na Tabela 12, tendo resultados iguais para ambos. Os demais tratamentos utilizados no teste obtiveram diferenças estatísticas, tendo $p < 0,05$ e $p < 0,01$. Sant' Ana (2002) afirma que a *C. glabrata* e *C. albicans* possuem baixa susceptibilidade aos antifúngicos convencionais. Isso pode explicar o porquê as concentrações baixas não obtiveram resultados positivos. Costa (2013) obteve para o extrato hidroalcoólico de angico CIM para as espécies *C. tropicalis* e *C. albicans* o resultado de 25 e 12,5 mg/mL, respectivamente.

Tabela 12. Concentrações e leitura de absorbância para o EP sólido sobre a *C. albicans*.

EP sólido para <i>C. albicans</i>		
Concentrações	Médias das triplicatas	
	0 hora	24 horas
18 mg/ml	0,880	0,114
16 mg/ml	0,121	0,135*
14 mg/ml	0,138	0,147*
12 mg/ml	0,115	0,251*
10 mg/ml	0,102	0,255*
8 mg/ml	0,084	0,268*
6 mg/ml	0,091	0,291*
4 mg/ml	0,071	0,387*

*Valores que diferiram estatisticamente, tendo $p < 0,05$.

O controle positivo para a *C. albicans* obteve a CIM equivalente a concentração de 1024 mg/ml. O que torna a concentração do EP sólido uma alternativa confiável para utilização. É observado também a resistência por meio do patógeno fúngico sobre a atuação do antibiótico. Panizo (2001) afirma que os primeiros relatos sobre a resistência da *Candida* ao fluconazol foram obtidos logo após o surgimento do antibiótico. E, ainda segundo Sant' Ana (2002) estudos calcularam a ocorrência da resistência clínica do fluconazol, da qual foi obtida em um intervalo de 6% a 36%, variando esses valores de acordo o grupo de pacientes e o uso.

6. CONCLUSÃO

O extrato pirolenhoso em gel e sólido sobre a *Escherichia coli* possui potencial antibactericida, onde as concentrações recomendadas para o tratamento são de 1 ml, para o EP em gel, valor obtido para a CIM e CBM. Para o EP sólido 10 mg/ml, valor da CIM e CBM igual a 16 mg/ml.

A utilização do extrato pirolenhoso em gel e sólido sobre a *Candida albicans* também apresentou resultados favoráveis, obtendo o valor de CIM e CFM iguais para o gel, equivalente a 1 ml. Para o EP sólido a CIM e CFM também tiveram resultados iguais: 18 mg/ml, confirmando que em ambas as concentrações ocorreram a ação antifúngica do extrato pirolenhoso.

Ainda, é importante destacar a continuidade dos estudos utilizando o EP em gel e sólido contra patógenos, bem como a padronização dos tratamentos, testando concentrações menores de que as utilizadas a fim de verificar o desempenho. Além de iniciar pesquisas que envolvam o tratamento in vivo utilizando as novas formulações do extrato.

7. REFERÊNCIAS

ABURTO, L.C., TAVARES, D.Q, MARTUCCI, E.T. Microencapsulação de óleo essencial de laranja. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, v.18, n.1, p. 45-48, 1998.

AHMED, W.; TUCKER, J.; BETTELHEIM, K. A.; NELLER, R.; KATOULI, M. Detection of virulence genes in *Escherichia coli* of an existing metabolic fingerprint database to predict the sources of pathogenic *E. coli* in surface waters. *Water research*. 2007;41(16):3785-3791.

AKPAN, A; MORGAN, R. Oral candidiasis. *Postgraduate Medical Journal*, v. 78, p. 455-459, 2002.

ALEXANDER, R. J. Maltodextrins: production, properties, and applications. In: Schenck, F.W.; Hebeda, R.E. (Ed.). *Starch Hydrolysis Products: Worldwide Technology, Production and Applications*. New York: VCH Publishers, p. 233-275, 1992.

ALVES, M.; CAZETTA, J. O.; NUNES, M. A.; OLIVEIRA, C. A. L.; COLOMBI, C. A. Ação de diferentes preparações de extrato pirolenhoso sobre *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes). *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 29, n. 2, p. 382-385, 2007.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Centro de Vigilância Epidemiológica. Manual das Doenças Transmitidas por Alimentos. São Paulo. 2002. Disponível em: Acesso em: 12 dez. 2021.

ARAÚJO, M.G.F.; HILÁRIO, F.; NOGUEIRA, L.G.; VILEGAS, W.; SANTOS, L.C. & BAUAB, T.M. Chemical constituents of the methanolic extract of leaves of *Leothrix spiralis* and their antimicrobial activity. *Molecules*, v. 16, p. 10479-10490, 2011.

ARAÚJO, C.A.C.; LENON, L.L. Biological activities of *Curcuma longa* L. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Vol. 96, p.723-728. 2001.

ARAÚJO, E. S. Potencial antibacteriano e antifúngico do extrato pirolenhoso. Dissertação de Mestrado. 2018

ARTHINGTON-SKAGGS, B. A, REX, J. H. Resistance to Antifungal Agents. In: Fong IW, Drlica K. Antimicrobial resistance and implications for the 21th century. Springer. 2008.

BACARRO, M. R.; MORENO, A. M.; CORRÊA, A.; FERREIRA, A. J. P.; CALDERARO, F. F. Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarreia. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 69, n. 2, p. 15-18, 2002.

BARCELLOS, D. C. Forno container para a produção de carvão vegetal: desempenho, perfil térmico e controle da poluição. 2002. 72p. Tese (M.S. em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

BARROS, S. L. et al. Influence of pulp, sugar and maltodextrin addiction in the formulation of kiwi jellies with lemon grass tea. *Journal of Agricultural Science*, 11 (15, 1-10), 2019.

BARROSO, A. J. R. et al. In: VOIGT, C. L. (org.). Impactos das Tecnologias na Engenharia Química. Ponta Grossa/PR, 2019. v.2. p. 232-236.

BONGERS, J.H., FRANSSEN, F.; ELBERS, A.R.W., TIELEN, M.J.M. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from the faecal flora of veterinarians with different professional specialities. *Vet. Quart.*, v.17, p.146-149, 1995.

BRITO, J. O. Princípios de produção e utilização de carvão vegetal de madeira. Documentos Florestais, Piracicaba, v. 9, p. 1-19, 1990.

BROWN, N.A.C; VAN STADEN, J. Smoke as a germination cue: a review. *PlantGrowthRegulation*, Pietermaritzburg, v. 22, n. 2, p. 115-124, 1997.

CALDERONE, R. A.; GOW, N. A. Host recognition by *Candida* species. *Candida and candidiasis*. ASM Press, Washington, DC, p. 67-86, 2002.

CAMPOS, A. D. Técnicas para a produção de extrato pirolenhoso para uso agrícola. Pelotas: Embrapa, 8 p., 2007 (Circular Técnica, nº 65).

CAMPOS, Ângela Diniz. Técnicas para produção de extrato pirolenhoso para uso agrícola. Embrapa Clima Temperado-Circular Técnica (INFOTECA-E), 2007.

CLERMONT, O.; BONACORSI S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and environmental microbiology*. 2000;66(10):4555-4558.

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; Approved guideline - CLSI document M27A7, v. 26, n. 2, Wayne, Pennsylvania, USA, 2006.

COSTA, N. C.; RIBEIRO, E. E. C. Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro dos extratos hidroalcoólico de *Cymbopogon citratus*, *Chenopodium ambrosioides*, *Allium sativum*, *Allium cepa* e casca de *Saccharum officinarum* e *Punica granatum* sobre bactérias e fungos de interesse clínico. Anais do Conic – Semesp – Faculdade Anhanguera de Campinas. V. 1, 2013.

CRISTALE, J.; SILVA, F. S.; MARCHI, M. R. R. Desenvolvimento e aplicação de método GC-MS/MS para análise simultânea de 17 HPAS em material particulado atmosférico. *Eclética Química*, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 69-71, 2008.

DE MELO, R. M.; SILVA, R. M.; DE BARROS, R. O. M.; MAZORCHE, R. M.; DE QUEIROZ, V. T.; POVOA, H. C. C. Estudo da atividade antimicrobiana do licor pirolenhoso em bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Serratia*. Revista Científica da FAMINAS, Muriaé, v. 3, n. 1, supl. 1, p. 47, 2007.

DE SOUZA, G. C.; HAAS, A. P.; VON POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E. E.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. J Ethnopharmacol 90: 135–143, 2004.

DHO-MOULIN, M.; FAIRBROTHER, J. M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). Veterinary research. 1999;30(2):299-316.

DONDE, A. R. et al. Avaliação in vitro de extratos vegetais no desenvolvimento micelial de *Phytophthora* sp. Seminário de Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos, Alta Floresta, n. 1, set. 2013.

EDUARDO, J. C. C.; GAVA, I. A. O uso de vacinas na profilaxia das infecções do trato urinário. J. Bras. Nefrol. 2012; 34(2): 178-183

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). 21 Code of Federal Regulations, Rockville, 2003. v. 3, sec. 184.1444, p. 523. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/FCF184.html>>. Acessado em: 19.01.2022.

FURLAN, M. R. 1998. Cultivo de plantas medicinais. Vol. XIII. Coleção Agroindústria. Sebrae-MT, Cuiabá. 137 p.

GILPIN, B. J.; GREGOR, J. E.; SAVILL, M. G. Identification of the source of faecal pollution in contaminated rivers. Water science and technology. 2002;46(3):9-15.

Gow, NA; & Yadav, B. Microbe profile: *Candida albicans*: a shape-changing, opportunistic pathogenic fungus of humans. Microbiology, v. 163(8), p. 1145-1147, 2017.

GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J. G.; THOEN, C. O. Pathogenesis of bacterial infections in animals. ed. editor^editors.: John Wiley & Sons; 2011.

HERZER, P. J.; INOUE, S.; INOUE, M.; WHITTAM, T. S. Phylogenetic distribution of branched RNAlinked multicopy single-stranded DNA among

natural isolates of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. 1990;172(11):6175-6181.

JANKOWSKY, L. et al. Antimicrobial Activity of the Methanolic Fraction of Bamboo Pyroligneous Liquor. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 6, p. 924-934, 2018.

JOHNSON, T. J.; KARIYAWASAM, S; WANNEMUEHLER, Y; MANGIAMELE, P.; JOHNSON, S. J.; DOETKOTT, C.; SKYBERG, J. A.; LYNNE, A. M.; JOHNSON, J. R.; NOLAN, L. K. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1: K1: H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *Journal of bacteriology*. 2007;189(8):3228-3236

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T.; Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2 (2): 123-140, 2004.

KUMAMOTO, C. A. Inflammation and gastrointestinal *Candida* colonization. *Curr. Opin. Microbiology*; v. 14, p. 386–391, 2011.

KUNTZ, L.A. Making the most of maltodextrins. *Food Product Design*, Phoenix, Aug.1997. Disponível em: <<http://www.foodproductdesign.com/articles/0897DE.html>>. Acessado em: 19.01.2022

KURTZMAN, C. P; FELL, J. W; BOEKHOUT, T.The Yeasts: A taxonomic study. 5th ed. Amsterdam.Elsevier Science Publisher, p. 1075, 2010.

LANGFIELD, R. D.; SCARANO, F. J.; HEITZMAN, M. E.; KONDO, M.; HMMOND, G. B.; NETO, C. C. Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*. *J. Ethnopharmacol.*, v. 94, p. 279 - 281, 2004.

LEEKHA, S.; TERRELL, C. L.; EDSON, R. S. General principles of antimicrobial therapy. *Mayo Clin. Proc.*, v. 86, n. 2, p. 156-167, 2011.

LOHSE, M. B; GULATI, M; JOHNSON, A. D; NOBILE, C. J. Development and regulation of singleand multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, v.16(1), p.19, 2018.

LORENZÓN, E. N.; CESPEDES, G. F.; VICENTE, E. F.; NOGUEIRA, L. G.; BAUAB, T. M.; CASTRO, M. S.; CILLI, E.M. Effects of dimerization on the structure and biological activity of the antimicrobial peptide Ctx-Ha. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012, doi:10.1128/AAC.06262-11.

MACIEL, E. R. F. Extrato pirolenhoso no controle de microorganismos fitopatogênicos. 37 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Florestal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2020.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F.Jr.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim. Nova.* v.25, p.429-438, 2002.

MAEKAWA, K. Curso sobre produção de carvão, extrato pirolenhoso e seu uso na agricultura (APAN ± Associação dos produtores de Agricultura natural), 2002. (Mimeo).

MAINIL, J. Escherichia coli virulence factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 2013;152(1):2-12

MARCHAL, L.M.; BEEFTINK, H.H.; TRAMPER, J. Towards a rational design of commercial maltodextrins. *Trends in Food Science and Technology*, Cambridge, v. 10, n. 11, p. 345-355, Nov. 1999.

MEDEIROS, L. C. V. Ação antimicrobiana in vitro dos decoctos in natura e pasteurizado das folhas de libidibia ferrea (jucá) em bactérias potencialmente infectantes para animais. 2020.

MIYASAKA, S.; OHKAWARA, T.; NAGAI, K.; YAZAKI, H.; SAKITA, M.N. Técnicas de produção e uso do Fino de Carvão e Licor Pirolenhoso In: I ENCONTRO DE PROCESSOS DE PROTEÇÃO DE PLANTAS: Controle ecológico de pragas e doenças, 2001, Botucatu. Resumo... Botucatu: APAN, 2001. p.161-176.

NASCIMENTO, G. G. F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v.31, n.2, p.247-256, 2000.

OLIVER, W.T.; MATHEWS, S.A.; PHILLIPS, O.; JONES, E.E.; ODLE, J; HARREL, R.J. Efficacy of partially hydrolyzed corn syrup solids as a replacement for lactose in manufactured liquid diets for neonatal pigs. *Journal of Animal Science*, v. 80, n. 1, p. 143-153, 2002.

PANIZO, M. M.; REVIÁKINA, V. *Candida albicans* y su efecto patógeno sobre las mucosas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, v. 21, n. 2, p. 38-45, 2001.

PANIZO, M. M; REVIÁKINA, V. *Candida albicans* y su efecto patógeno sobre las mucosas. *Rev Soc Ven Microbiol*. 2001;21:38-45.

PAPPAS, P. G. Invasive candidiasis. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, v. 20, n. 3, p. 485-506, 2006.

PIETA, S. Eficácia de extratos pirolenhosos de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) e eucalipto (*Eucalyptus* spp.) no controle in vitro de patógenos da soja. Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal (Tese de mestrado) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados. 2017.

PIMENTA, A. S.; BAYONA, J. M.; RAMÓN, T. G.; CÁNOVAS, A. M. S. Evaluation of acute toxicity and genotoxicity of liquid products from pyrolysis of *Eucalyptus grandis* Wood. *Environmental Contamination and Toxicology*. USA, v. 38, n. 2, p. 169-175, 2000.

PRIETO, D; ROMAN, E; CORREIA, I; PLA, J. The hog pathway is critical for the colonization of the mouse gastrointestinal tract by *Candida albicans*. *Plos One*, v. 9(1); p. e87128, 2014.

QUADROS, C. L. Produção de Carvão Vegetal, In: MASSAMBANI, O., Coletânea de Respostas Técnicas, São Paulo: USP, p. 582-607, 2005.

SANT'ANA, P. L.; MILAN, E. P.; MARTINEZ, R.; QUEIROZ-TELLES, F.; FERREIRA, M. S.; ALCÂNTARA, A. P. Multicenter Brazilian study of oral *Candida* species isolated from Aids patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97:253-7.

SANTOS, M. H. C. Estudo da interação e efeito modulador de uma lectina presente nas sementes de *Machaerium Acutifolium* Vogel e o antibiótico gentamicina em bactérias multirresistentes. 2019.

SARTORATTO, A.; MACHADO A.; DELARMELENA, C. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2004; 35(4): 275-280.

SHAHIDI, F., HAN, X.Q. Encapsulation of Food Ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; v.33, n.6, p.501-547, 1993.

SILVA, A. S.; ZANETTI, R.; CARVALHO, G. A.; MENDONÇA, L. A. Qualidade de mudas de eucaliptos tratadas com extrato pirolenhoso. *Revista Cerne*, v. 12, n. 1, p. 19-26, 2006.

SILVA, T. C. L.; ALMEIDA, C. C. B. R.; VERAS FILHO, J.; PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S.; AMORIM, E. L. C.; COSTA, E. P.; ARAÚJO, J. M. Atividades antioxidante e antimicrobiana de *Ziziphus joazeiro* mart.(Rhamnaceae): avaliação comparativa entre cascas e folhas. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, Refice*, v. 32, n. 2, p. 193-199, jan. 2011.

SILVA, V.; CRISTINA DÍAZ, M. J.; NALDY, F.; y Red De Diagnóstico en Micología Médica. Vigilancia de la resistencia de leveduras a antifúngicos. *Revista chilena de infectologia*, v.19, Supl.2, 2002.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P; GROSMAN, G.; MELLO, J. C. P; MENTZ, L. A; PETROVICK, P. R. *Revista Brasileira de Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1102p, 2007.

SOUZA, P. M.; SALES, P. M.; SIMEONI, L. A.; SILVA, E. C.; SILVEIRA, D.; MAGALHÃES, O. Inhibitory activity of α -amylase and α -glucosidase by plant extracts from the Brazilian cerrado. *Planta. Med.*, v. 78, n. 4, p. 393-399, 2012.

SOUZA-SILVA, A. et al. Qualidade de mudas de eucalipto tratadas com extrato pirolenhoso. *Cerne, Lavras*, v. 12, n. 1, p. 19-26, jan./mar. 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CHRISTINE, L. *Case-Microbiologia*. Editora Artmed. 8ª ed. São Paulo: 2005.

ULETT, G. C.; TOTSIKA, M.; SCHAALE, K.; CAREY, A. J.; SWEET, M. J.; SCHEMBRI, M. A. Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. *Current Opinion in Microbiology*, 16: 100-107, 2013.

VIEIRA, A. J. H.; SANTOS, J. I. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. *RBAC*, v. 49, n. 3, p. 235-9, 2017.

VILA, J.; SÁEZ-LÓPEZ, E.; JOHNSON, J.R.; ROMLING, U.; DOBRINDT, U.; CANTÓN, R.; GISKE, C. G.; NAAS, T.; CARATTOLI, A.; MARTÍNEZ-MEDINA, M.; BOSCH, J.; RETAMAR, P.; RODRÍGUEZ-BAÑO, J.; BAQUERO, F.; SOTO, S.M. *Escherichia coli*: na old friend with new tidings. *FEMS Microbiol Rev*, 40(4): 437-463, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Containing antimicrobial resistance. Geneva, Switzerland: WHO; 2005. (WHO Policy Perspectives on Medicines; 10).

WORLD HEALTH STATISTICS 2016: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals. Geneva: World Health Organization; 2016.

YAMAMOTO, S.; TSUKAMOTO, T.; TERAJ, A.; KURAZONO, H.; TAKEDA, Y.; YOSHIDA, O. Genetic evidence supporting the fecal-perineal-urethral hypothesis in cystitis caused by *Escherichia coli*. *J Urol* 157:1127–1129. 1997.