



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

FLÁVIO SANTOS BOMFIM

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE EXTRATOS DE PLANTAS
MEDICINAIS FRENTE A ISOLADOS CLÍNICOS DE CANDIDA**

Recife
2018

FLÁVIO SANTOS BOMFIM

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE EXTRATOS DE PLANTAS
MEDICINAIS FRENTE A ISOLADOS CLÍNICOS DE CANDIDA**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

Co-orientadora: Prof. Dra. Rejane Pereira Neves

Recife

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Bomfim, Flávio Santos

Avaliação do potencial antifúngico de extratos de plantas medicinais frente a isolados clínicos de Candida/ Flávio Santos Bomfim- 2018.

74 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Luiz Alberto Lira Soares

Coorientadora: Rejane Pereira Neves

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica. Recife, 2018.

Inclui referências

1. Plantas medicinais 2. Agentes antifúngicos 3. Candidíase I. Soares, Luiz Alberto Lira (orient.) II. Neves, Rejane Pereira (coorient.) III. Título

615.321

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-377

Elaborado por Elaine C. Barroso CRB4/1728

FLÁVIO SANTOS BOMFIM

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS
FRENTE A ISOLADOS CLÍNICOS DE CANDIDA**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 14 / 06 / 2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof (a). Dra. Rejane Pereira Neves (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof (a). Dra. Ana Maria Rabelo de Carvalho Parahym (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Armando Mardens (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof (a). Dra. Carolina Maria da Silva (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

A Deus, que por sua infinita graça me concedeu a oportunidade de chegar ao final de mais essa etapa da minha vida, permitindo-me concluir esse Doutorado.

Agradeço aos meus pais, José Pulo Nascimento e Maria Dulceleide Nascimento, por sempre incentivar e apoiar todas as decisões importantes que eu realizei até hoje. Obrigada por vocês cuidarem de mim com tanto zelo e amor. Minhas conquistas só foram possíveis porque eu tenho vocês ao meu lado.

A toda minha família, pelo apoio, especialmente aos meus irmãos Viviane Bomfim, Paulo Vinicius e Gleidston Santos Nascimento, minha avó Maria Nalde dos Santos por me incentivarem em todas as minhas escolhas.

A meu orientador Prof. Luiz Alberto Lira Soares, pelo exemplo de profissional, pela orientação, dedicação, paciência, disponibilidade, apoio e amizade, indispensáveis para a conclusão deste trabalho.

A Prof^a. Rejane Pereira Neves, pela coorientação, por também ser um exemplo de profissional e por toda contribuição científica e minha segunda mãe.

Aos (as) Professores (as) do departamento de Micologia Médica da UFPE Prof. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto, Prof. Armando Marsden Lacerda Filho, Prof^a. Danielle Patrícia Cerqueira de Macêdo, Prof^a Ana Maria Rabello, Prof^a. Rejane Pereira Neves e Prof^a. Oliane Maria Correia Magalhães por toda ajuda contribuição científica e amizade.

Aos professores das disciplinas cursadas durante o Doutorado, contribuindo significativamente para minha formação acadêmica e profissional.

Aos funcionários dessa Instituição, em especial Rubens Moraes(*in memoriam*).

A todos os colegas que fazem parte do Departamento de Micologia, especialmente do Laboratório de Micologia Médica, aos colegas de turma e a todos que conheci durante o Doutorado, e amigadas formadas. Em especial a Crisdiano Araujo, Renan Barros e meu irmão de longa data Jadson Bezerra, por está sempre ajudando durante a fase experimental.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE).

“A vida é o nosso maior desafio porque nunca podemos fugir dela. Ela é o caminho onde construimos a história que nos distingue de todos os outros. Mas às vezes a vida se complica e cada dia que vivemos as dificuldades parecem se multiplicar, e ficamos paralisados, sem saber como agir. É preciso determinação para vencer essas adversidades que tornam a vida difícil. É necessário ter muita força e principalmente jamais desistir de lutar”

Yves Gasana

RESUMO

As plantas utilizadas na medicina popular vêm sendo estudadas devido as suas propriedades terapêuticas. Diversos estudos comprovam que a biodiversidade vegetal possui compostos promissores na produção de novos fármacos, principalmente nas espécies vegetais do Nordeste Brasileiro. Com o rápido surgimento de resistência de microrganismos, diante disso a busca por novos agentes terapêuticos eficazes tem se tornado uma alternativa favorável no combate às doenças causadas por fungos, principalmente espécies *Candida* sp. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo extrair, caracterizar, isolar e purificar metabólitos bioativos de plantas medicinais utilizadas no estado de Pernambuco e avaliar seu potencial antifúngico *in vitro* e *in vivo* frente cepas de *Candida* sp. Foram utilizados cinco extratos de plantas medicinais obtidos a partir de extratos das folhas de *Eugenia uniflora* L., *Psidium guajava* L., e *Persea americana* Mill. e cascas do caule de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) e *Schinus terebinthifolius* Raddi. Posteriormente, foi avaliada a atividade antifúngica desses frente a cinco espécies de *Candida*: *C. albicans* 12680, *C. tropicalis* 10660, *C. krusei* 14206, *C. glabrata* 14188, *C. guilliermondii* 14495 e um isolado de referência *C. parapsilosis* ATCC 22019, para a determinação da concentração inibitória mínima, de acordo com o protocolo do CLSI(M27-A3). Para critério de comparação do potencial antifúngico foram utilizados os fármacos anfotericina B (*Bristol-Myers Squibb*) e fluconazol. Os extratos bioativos foram testados isoladamente e em conjunto para verificação do sinergismo que foi procedido conforme o método de Checkerboard. A atividade antifúngica *in vivo* foi realizada de acordo com o modelo de infecção experimental de candidíase sistêmica, em cinco grupos com oito ratos *Wistar*. Após a realização dos testes foi verificado que o extrato acetato aquoso (Act/Aq) de *E. uniflora* apresentou a melhor concentração inibitória, variando de $4\mu\text{g.mL}^{-1}$ a $32\mu\text{g.mL}^{-1}$, seguido pelo Act/Aq da *P. americana* com a CIM variando de $32\mu\text{g.mL}^{-1}$ a $128\mu\text{g.mL}^{-1}$. Também para *P. guajava* e *S. terebinthifolius* foram obtidas CIM de $32\mu\text{g.mL}^{-1}$ a $256\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $32\mu\text{g.mL}^{-1}$ a $1024\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente, sendo necessário a continuação do estudo de purificação e elucidação estrutural dos compostos presentes, a fim de verificar se a ação antifúngica encontrada poderá ser atribuída a um composto específico ou depende de algum mecanismo sinérgico da mistura de polifenóis. Diante dos resultados podemos concluir que o extrato Act/Aq de *E. uniflora* possui promissora ação antifúngica. Candidemia experimental mostrou que o extrato de *E. uniflora* apresenta uma resposta terapêutica mais efetiva ao fluconazol além de não haver toxicidade aguda relatada *in vivo*.

Palavras-chave: *Candida* sp. candidíase. Sensibilidade antifúngica. Alternativas terapêuticas. Plantas medicinais. Sinergismo.

ABSTRACT

The plants used in popular medicine have been studied due their therapeutic properties. Several studies show that vegetal biodiversity has promising compounds in the production of new drugs, mainly in the vegetal species of the Brazilian northeast. With the fast emergence of micro-organisms resistance, the search for new effective therapeutic agents has become a favorable alternative in the fight against diseases caused by fungi, mainly *Candida* sp species. Thus, the Objective of this study is to perform a screening of plant extracts in medicinal plants of the Brazilian northeast, and to evaluate its antifungal potential ahead of the clinical isolates of *Candida* sp. Methods were used in five medicinal plants, from Leaves Extracts of *Eugenia uniflora* L., *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.), barks stalk of Ferra (Mart. exTul.), *Schinus terebinthifolius* Raddi., leaves of *Psidiumguajava* L., and *Persea american* Mill. In contrast of five species of *Candida*: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* and an isolate reference of *C. parapsilosis* ATCC 22019, for the determination of the minimum inhibitory concentration, according to the document M27-A3. The commercially available antifungals evaluated were amphotericin B (Bristol-Myers Squibb) diluted in DMSO and fluconazol ediluted in water. The synergism test was followedby the Checkerboard method. The antifungal activity in vivo was performed according to the experimental infection model of systemic candidiasis, in Five groups with eight Wistar mice. Results the aqueous acetate extract (ACT/Aq) E. was the Best inhibitory concentration, ranging from 4 mg. mL⁻¹ to 32 mg. mL⁻¹, followed by *P. american* Extract Act/Aqcomto CIM varying de32 μ g. mL⁻¹ to 128 mg. mL⁻¹. Also for *P. guajava* and *S. terebinthifolius* the extra cthead CIM' swith 32 mg. mL⁻¹ to 256 mg. mL⁻¹ and 32 mg/mL⁻¹ to 1024 μg. mL⁻¹ respectively, beingnecessaryto continue the study of purification and structural elucidation of the present compounds in order to verify the Fungal action found could be attributed to a specific compound or depends on some synergic mechanism of mixing polyphenols. Conclusion: E. uniflora has promising antifungal action. Experimental candidemia showed that the extract of *E. uniflora* has a more effective therapeutic response to the fluconazole further more thereis no acute toxicity reported in vivo.

Keywords: *Candida* sp. candidiasis. Antifungal sensitivity. Therapeutic alternatives. Medicinal plants. Synergy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Estrutura química da anfotericina B.....	23
Figura 2– Mecanismo de ação da anfotericina.	24
Figura 3 – Estrutura química básica dos flavonoides.	30
Figura 4 – Taninos: hidrolisáveis (A/B) e condensados (C).	31
Figura 5– Esquema da distribuição de duas drogas diferentes para avaliação do sinergismo. Droga A colocada na vertical e diluída em sentido horizontal da direita para esquerda. Droga B colocada na horizontal e diluída em sentido vertical de cima para baixo.	42
Figura 6 – Método de <i>Checkerboard</i> resultante da combinação de duas drogas. Concentrações compreendidas no encontro dos eixos de da ordenada e abcissas ($\mu\text{L.mL}^{-1}$).	42
Figura 7 – Método E-test para a determinação da interação medicamentosa de dois fármacos diferentes.	44
Figura 8 – Perfil cromatográfico de <i>Eugenia. uniflora</i> por CLAE-DAD. Teores calculados por CLAE: Pico 1: ácido gálico: 0,22g%. Pico 3: flavonóide: 0,48g%.	50
Figura 9 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) em $\mu\text{g/ml}$	52
Figura 10 – Sobrevivência acumulada a partir do primeiro dia da infecção entre os diferentes grupos de animais. G1 = apenas imunossuprimido; G2 = imunossuprimido+ infectado; G3 = imunossuprimido infectado + tratado com fluconazol; G4 = imunossuprimido infectado + tratado com anfotericina B e G5 = imunossuprimido infectado + tratado com extrato de <i>E.uniflora</i>).	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Classe de compostos fenólicos encontrados em plantas, de acordo com suas estruturas químicas.....	28
Tabela 2 – Plantas medicinais do Nordeste brasileiro selecionadas para o estudo.	46
Tabela 3 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/ml de Extratos Brutos, Ácido gálico, Anfotericina B e Fluconazol, frente a Isolados Fúngicos.....	53
Tabela 4 - Avaliação do Sinergismo de <i>Eugenia uniflora</i> L.e Ácido Gálico combinado com Anfotericina B (AMB) e Fluconazol (FLU). Frente a isolados de fungico de <i>Candida</i> spp	54
Tabela 5 - Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos de ratos <i>Wistar</i> fêmeas antes da infecção. Valores expressos em média ±. Desvio padrão e (n) – número de animais.	55
Tabela 6 - Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos de ratos <i>Wistar</i> fêmeas após o tratamento da infecção. Valores expressos em média ±. Desvio padrão e (n) – número de animais.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	Anfotericina B
ATCC	American Type Culture Collection
CCS	Centro de Ciências da saúde
CCD	Cromatografia de camada delgada
CGB	Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
DL	Dose letal
DMSO	Dimetilsulfoxido
EB	Extrato bruto
FAE	Fração acetato de etila
FAQ	Fração aquosa
FICI	Índice da Concentração Inibitória Fracionária
FLU	Fluconazol
GXM	Glucuronoxylomannan
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
ml	mililitro
Mg	Miligrama
MS	<i>Mass Spectrometer</i>
TOF	<i>Time of Flight</i>
ITC	Itraconazol
RPM	Rotação por minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônia por mililitro
μL	Micro litro
μg.mL ⁻¹	Micrograma por mililitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 OBJETIVOS.....	15
1.1.1 Objetivo Geral.....	15
1.1.2 Objetivos Específicos.....	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1 CANDIDÍASE.....	17
2.2 ESPÉCIES DE CÂNDIDA.....	18
2.2.1 C. albicans.....	18
2.2.2 C. tropicalis.....	18
2.2.3 C. krusei.....	19
2.2.4 C. glabrata.....	19
2.2.5 C. guilliermondii.....	20
2.2.6 C. parapsilosis.....	21
2.3 TERAPIA ANTIFÚNGICA.....	21
2.3.1 Antifúngicos convencionais.....	21
2.3.2 Anfotericina b.....	22
2.3.3 Fluconazol.....	24
2.4 PRODUTOS NATURAIS.....	25
2.4.1 Compostos fenólicos.....	27
2.4.2 Flavonóides.....	29
2.4.3 Taninos.....	31
2.4.4 Espécies vegetais.....	33
2.4.4.1 Anadenanthera colubrina (Vell).....	33
2.4.1.2 Eugeniauniflora L.....	34
2.4.4.3 Libidibia ferrea (Mart).....	35
2.4.4.4 Schinus terebinthifolius Raddi.....	36
2.4.4.5 Psidium guajava L.....	38
2.4.4.6 Persea americana Mill.....	38
2.4.4.7 Mimosa ophthalmocentra Mart.....	39
2.4.4.8 Parapiptadenia rígida Benth.....	39
2.4.4.9 Mimosa tenuiflora Willd.....	40
2.5 SINERGISMO E MÉTODOS DE AVALIAÇÃO.....	40

2.5.1 Método de <i>Checkerboard</i>	41
2.5.2 Método de <i>Time-Kill</i>	43
2.5.3 Método Epsilométrico (e-test).....	43
3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	45
3.1 CULTURAS FUNGICAS	45
3.3.1 Identificação dos isolados por Espectrometria de Massas (MALDI-TOF MS).....	45
3.2 MATERIAIS VEGETAIS	46
3.2.1 Preparação dos extratos brutos (EB)	46
3.2.2 Obtenção da fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa (FAQ).....	47
3.2.3 Caracterização dos extratos brutos.....	47
3.2.4 Atividade antifúngica dos extratos in vitro	47
3.2.5 Sinergismo	48
3.3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA IN VIVO.....	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 PERFIL QUÍMICO DE <i>E. UNIFLORA</i> L.....	50
4.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>CANDIDA</i> POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MALDI-TOF MS).....	51
4.3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA IN VITRO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE PLANTAS MEDICINAIS.....	51
4.4 AVALIAÇÃO DO SINERGISMO DE <i>E. UNIFLORA</i> E ÁCIDO GÁLICO EM COMBINAÇÃO COM ANFOTERICINA B E FLUCONAZOL	54
4.5 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VIVO</i> DO EXTRATO BRUTO DE <i>E. UNIFLORA</i> ..	55
4.6 TOXIDADE	59
5 CONSIDERAÇÃO FINAL	60
REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

Na micologia médica, leveduras do gênero *Candida* apresentam grande importância na medicina, por serem agentes etiológicos oportunistas, frequentemente isoladas em pacientes de unidade de terapia intensiva, representando um problema de saúde pública, devido aos altos índices de mortalidade (HINRICHSEN et al., 2009). A *Candida* estar presente em grande parte do corpo humano, como: pele, trato geniturinário e digestivo (GÁLVAN et al., 2006).

Pacientes imunocomprometidos têm possibilidades com maior frequência de serem afetados por infecções fúngicas, do mesmo modo os indivíduos com leucemia, linfoma, diabetes mellitus e a síndrome da imunodeficiência adquirida (LIMA et al., 2006).

Outras condições como o a realização de quimioterapia, procedimentos cirúrgicos, transplante de órgãos, IST (infecções sexualmente transmissíveis), e doenças autoimunes, a exemplo de lúpus eritematoso sistêmico, também favorecem o surgimento dessas infecções. Tais fatores causam o desequilíbrio da microbiota ou diminuem a capacidade funcional do sistema imune do hospedeiro (PEIXOTO et al., 2014).

As leveduras do gênero *Candida* vêm aumentando sua resistência frente aos antifúngicos disponíveis no mercado, diante disso, cresce as pesquisas de novos fármacos, principalmente baseados na fitoterapia, devido às atividades antifúngicas já conhecidas em plantas medicinais (ABÍLIO et al., 2014). Considerando que os antifúngicos disponíveis no mercado, na maior parte das vezes, apresentam deficiência de uso por parte da resistência dos microorganismos, e reações colaterais, os resultados finais elevam o crescimento na taxa de recaída (GLEHN et al., 2012). As principais espécies de *Candida* com maior frequência em infecções oportunistas incluem *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. guilliermondii* (DIEKEMA et al., 2012).

Os antifúngicos de escolha dependem principalmente do sítio de infecção e das características imunológicas do hospedeiro. Os principais agentes recomendados e amplamente utilizados são, anfotericina B em uma dosagem de 0,5-1,0 mg/Kg/dia ou combinado com 5-flucitosina (100 mg/kg/dia) e fluconazol (400mg/dia) (PERFECT et al., 2010; SEVERO et al., 2009; BAILLY et al., 2015).

A caspofungina apresenta atividade fungicida in vitro contra todas as espécies de *Candida*, clinicamente importante em neonatos; porém os dados farmacocinéticos ainda são escassos nesse tipo de paciente tornando seu uso limitado (FEKKAR, et al., 2015).

Aliadas a busca de novas alternativas terapêuticas, as plantas medicinais vêm sendo utilizadas de diversas maneiras e com diferentes tipos de propósitos, seja com partes inteiras ou

sob a forma de preparos caseiros, com usos domésticos e religiosos, podendo ainda ser submetidas a sucessivos processos de extração e purificação, para isolamento das substâncias de interesse (ALBUQUERQUE et al., 2007). Alternativas terapêuticas a partir de plantas medicinais e seus compostos bioativos, embora, venham ganhando destaque em todo o mundo até o momento não são utilizadas clinicamente nos casos de candidíase. Diversos estudos são realizados com a finalidade de avaliar a capacidade antifúngica e antibacteriana de vegetais e seus compostos (CAMARGO et al., 2015; KOŁACZKOWSKA et al., 2016).

As propriedades terapêuticas observadas em plantas utilizadas na medicina popular comprovam numerosos compostos bioativos com potencial promissor na produção de novos fármacos (MORAIS-BRAGA et al., 2013). Haja vista, que, frequente resistência de microrganismos tem conduzido a busca por novos agentes terapêuticos, envolvendo pesquisas com vegetais desde Briófitas até Angiospermas quanto às atividades farmacológicas que apresentem alternativas no combate às infecções fúngicas (SANTOS et al., 2010).

Na medicina tradicional, as folhas das plantas são comumente utilizadas em diferentes países no tratamento de diversas doenças como: inflamação do útero, infecções do aparelho urinário, feridas de pele, diarréias e úlcera gastroduodenal (CORRÊA et al., 2008). O extrato hidroalcoólico *E. uniflora* (pitangueira) tem atividade antimicrobiana *in vitro* sobre *C. albicans*, *C. tropicalise* e *C. krusei*, com ação semelhante à clorexidina (0,12%), inibindo a síntese do glucano pela glicosiltransferase (CAVALCANTI et al., 2011).

A etnobotânica e a etnofarmacologia são poderosas ferramentas na busca por substâncias naturais bioativas, e embora ressaltem alguns fatores limitantes, tais como a dificuldade em coletar informações que sejam fidedignas, bem como o aspecto ético que envolve o acesso ao conhecimento tradicional, consideram que as informações sobre as plantas medicinais podem ser obtidas de maneira mais efetiva através do uso dessas ferramentas (ALBUQUERQUE e HANAZAKI, 2006).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Extrair, caracterizar, isolar e purificar metabólitos bioativos de plantas medicinais e avaliar seu potencial antifúngico *in vitro* e *in vivo* frente cepas de *Candida* sp.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o material vegetal de nove plantas medicinais;
- Obter a fração acetato de etila e a fração aquosa a partir do extrato bruto das plantas caracterizadas;
- Isolar, purificar e elucidar estruturalmente os metabólitos de interesse das plantas medicinais através de métodos físico-químicos;
- Determinar a concentração inibitória mínima dos isolados clínicos de *Candida* frente aos metabólitos de interesse através de testes de sensibilidade antifúngica *in vitro* padronizados pelo protocolo M27-A3 do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI);
- Avaliar *in vivo* o potencial antifúngico dos metabólitos de interesse através de modelo de candidíase experimental.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CANDIDÍASE

A infecção fúngica oportunista endógena mais frequente é a candidíase, geralmente ocorre em tecidos de hospedeiros que apresentam comprometimento nos sistemas específicos e inespecíficos de defesa, causando significativa mortalidade e morbidade, diante disso, as leveduras são consideradas fungos oportunistas, por estar presente em grande parte de infecções fúngicas no homem. Nas últimas décadas, a incidências de infecções causadas por leveduras vem crescendo, principalmente em doentes com Síndrome Imunodeficiência Adquirida (SIDA), pacientes com indicativo de transplantes e ou pacientes já transplantados (ABRANTES et al., 2013; PEIXOTO et al., 2014).

Os fungos do gênero *Candida* fazem parte da microbiota genitunário, da pele e do trato digestivo. (ALMEIDA et al., 2012). De acordo com NEGRI et al. (2010) a mortalidade atribuída direta ou indiretamente à candidemia é de 40% a 60%, podendo ter associação com outros tipos de doenças na maior parte dos casos.

A candidíase oral é identificada através de lesões das camadas da superfície do epitélio bucal, sendo acompanhada de placas brancas sobre a mucosa. Essa infecção geralmente ocorre em idosos, que tenha próteses dentaria e em pacientes portadores de diabetes mellitus (ABÍLIO et al., 2014; ALMEIDA et al., 2011). O aumento da prevalência em outros pacientes imunocomprometidos, dessa forma, inclui aquele convivendo com AIDS, deficiências nutricionais, também favorecem a ocorrência da candidíase bucal como um problema relativamente comum (GALL et al., 2013).

Segundo ANWAR et al. (2012) as espécies não-*albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* são as mais comuns nas infecções. As espécies de *Candida* não-*albicans* geralmente são as mais resistentes aos tratamentos convencionais, pois são responsáveis por mais de 33 % dos casos de recorrência da doença, as espécies de *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis* se proliferam em pacientes imunossuprimidos e pelo uso de antifúngico de maneira inadequada (MURAY et al., 2013).

A infecção mais frequente do trato geniturinário feminino são as vulvovaginites, na qual a principal é a candidíase vaginal, causada por leveduras que fazem parte da microbiota. A principal espécie envolvida na causa das infecções fúngicas é *C. albicans*, um fungo saprófito, que necessita das condições ambientais para poder se multiplicar, tornando-se patogênica, com isso, a candidíase não é considerada uma doença sexualmente transmissível.

Ela pode ocorrer quando há uma baixa no sistema imunológico ou quando ocorre um desequilíbrio da microbiota vaginal (VEDIYAPPAN et al., 2013; MENEZES et al., 2013; DIA, 2014).

As complicações sistêmicas causadas por candidíase são difíceis de tratar, além elevado custo do tratamento e disponibilidade fármaco no mercado (HESPANHOL et al., 2010).

2.2 ESPÉCIES DE CÂNDIDA

2.2.1 *C. albicans*

A *C.albicans* é uma espécie de levedura pertencente à microbiota normal de indivíduos saudáveis, no entanto na ocorrência de um desequilíbrio na relação com o hospedeiro pode causar danos a saúde do mesmo, pois geralmente é encontrada como causadora de lesões em pacientes imunocomprometidos e transplantados (CHAVES et al., 2012). A levedura tem formação de tubo germinativo com desenvolvimento da forma filamentosa, apresentando uma produção de toxinas e enzimas extracelulares, onde são os fatores mais importantes para o processo de infecção (MENEZES et al., 2013).

Segundo Keniya e colaboradores (2015) relataram que a *C.albicans* expressa fatores de virulência tais como: adesividade, alterações fenotípicas e morfológicas que resultam no sucesso do processo infeccioso.

A *C.albicans* se tornou a quarta principal causa de infecções nosocomiais, além de ser considerada oportunista por fazer parte da microbiota, essa levedura produz fosfolipase que é considerado um fator importante para o desencadeamento de infecções, com isso, essa enzima encontra-se localizada na superfície da levedura e na extremidade do tubo germinativo, causando danos à célula epitelial do indivíduo (VEDIYAPPAM et al., 2013). No tratamento da candidíase por *C. albicans* são utilizados: clotrimazol, miconazol, terconazol, nistatina, fluconazol, anfotericina B e voriconazol. Devido ao uso de maneira inadequada do antifúngico essa espécie vem apresentando uma resistência para determinados antifúngicos (CASTRO et al., 2006; BRUNTON et al., 2012; KENIYA et., 2015; HOF S et al., 2016).

2.2.2 *C. tropicalis*

A *C. tropicalis* é uma agente freqüente de candidemia em hospitais brasileiros, sendo a segunda espécie mais comumente isolada. A infecção por esse agente pode ocorrer em pacientes de todas as idades, mas acomete pacientes adultos e idosos com maior freqüência. No Brasil as

estatísticas apresentam três espécies isoladas de pacientes hospitalizados são: *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Pois estatística apresenta prevalências de 35,5 a 70% para *C. albicans*; 4,6 a 52,5% para *C. tropicalis* e 7 a 8,8% para *C. glabrata* (PASSOS et al., 2005; BAYEGAN et al., 2010; JIANG et al., 2013).

C. tropicalis encontra-se entre as espécies mais isoladas em pacientes com câncer, neutropenia e em uso prolongado de antibióticos, podendo estar relacionada a infecções do sangue e do trato urinário (NEGRI et al. 2012). É responsável por grande parte das candidemias em adultos, principal tem sido em pacientes com leucemia, outros tipos de câncer e diabetes mellitus. Essa espécie dificilmente encontrada em pacientes neonatos e apresenta virulência que a *C. albicans* em pacientes imunodebilitados (NEGRI et al., 2012; JIANG et al., 2013).

2.2.3 *C. krusei*

C. krusei vem demonstrando um patógeno fúngico resistente a um grande repertório de antifúngicos, principalmente com a baixa sensibilidade a anfotericina B. e aqueles que utilizam freqüentemente fluconazol, se tornando difícil tratamento principalmente em pacientes imunocomprometidos (ARENDRUP, 2013; COLOMBO et al., 2013).

A *C. krusei* mostra-se como um patógeno hospitalar ocasional, principalmente em pacientes portadores de doenças hematológicas malignas e/ou submetidos a transplante de medula óssea. Diante disso, alguns autores comprovaram aumento da ocorrência de fungemias causadas por *C. krusei* em pacientes neutropênicos expostos prolongadamente a fluconazo, pois essa levedura é naturalmente resistente ao fluconazol e talvez isso explique seu aumento em pacientes neutropênicos expostos a este antifúngico (HAKKI et al., 2006; ESCHENAUER et al., 2014).

2.2.4 *C. glabrata*

C. glabrata é citada como uma espécie da microbiota normal de indivíduos sadios. No entanto, nos últimos anos, devido aos medicamentos administrados em pacientes imunossuprimidos e com o aparecimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), se tornou uma principal infecção em seres humanos, causando candidíase em ambientes hospitalares. Nos Estados Unidos essa espécie causa infecções hematogênicas, com frequência em torno de 20 a 25% dos casos, acometendo pacientes transplantados de medula óssea, apresentando complicações do quadro infeccioso. Isolados de *C. glabrata* apresentam pouca

sensibilidade ao fluconazol e também anfotericina B (PERIROTH et al. 2007; HOFES et al. 2016; MCCARTY & PAPPAS, 2016).

Segundo Alexander e colaboradores (2013) a *C. glabrata* surge como importante patógeno hospitalar, constituindo-se na segunda ou terceira espécie mais comum na maior parte das séries de candidemia relatada nos EUA e Europa.

HOFES e colaboradores (2016) relataram que os isolados clínicos de *C. glabrata* apresentam menor sensibilidade ao fluconazol, sendo que avaliação de diferentes publicações mostra que cerca de 10% das amostras de *C. glabrata* recuperadas no sangue apresentam-se resistentes ao fluconazol. Além dos problemas terapêuticos de infecções por *C. glabrata* associados aos azólicos, Pfaller e cols vêm documentando a menor susceptibilidade de isolados desta espécie em relação a anfotericina B. Em uma pesquisa envolvendo 949 isolados clínicos de *C. glabrata*, observou-se que cerca de 53% das amostras avaliadas apresentaram MIC de anfotericina B maiores que 1mg/ml, valores estes considerados muito elevados para terapêutica com doses convencionais deste medicamento. (GARCIA-EFFRON et al., 2009; DURÁN-VALLE et al., 2012; LEWIS et al., 2013).

Grande aspecto interessante sobre a epidemiologia deste patógeno é sua maior ocorrência em pacientes idosos. Em estudo do Programa IEIEO, avaliando candidemia em 17 centros médicos do Estado de Iowa, observou-se que *C. glabrata* apresenta maior prevalência em pacientes idosos, sendo que respondeu por 25% de todas as fungemias documentadas em pacientes maiores de 65 anos (SHIELDS et al., 2012; MCCARTY & PAPPAS, 2016).

2.2.5 *C. guilliermondii*

Devido à sua menor frequência, as infecções causadas por *C. guilliermondii* são relativamente menos estudada, em comparação com infecções causadas por outras espécies de *Candida*. Tornando uma levedura oportunista, principalmente em pacientes com doenças oncológicas. É uma espécie com potencial de causar infecção na corrente sanguínea, particularmente, em pacientes com neoplasias hematológicas e internados em unidades de terapia intensiva (SAVINI et al., 2011; DICHTL et al., 2016).

O seu tratamento, apesar do número limitado de informações disponíveis na literatura, as pesquisas em in vitro relatam que à *C. guilliermondii* apresenta resistência clínicas à anfotericina B, assim como documentação de má resposta clínica de pacientes tratados com este poliênico. Sendo assim, há dúvidas sobre a real eficácia de anfotericina B na terapêutica de infecções sistêmicas por *C. guilliermondii* (ARENDRUP, 2013).

2.2.6 *C. parapsilosis*

C. parapsilosis vem causando infecções significativamente em pacientes transplantados, pacientes que se alimenta por sonda e principalmente em neonatos, pois em grande parte dos casos os profissionais da área de saúde vêm apresentando com frequência em suas mãos, sendo associada a casos de surtos nosocomiais com propagação clonal e transmissão horizontal. Esta espécie é frequentemente relacionada com infecção da corrente sanguínea em pacientes recém-nascidos, imunodeprimidos e previamente tratados com antifúngicos, sendo também associada ao uso de dispositivos intravasculares e nutrição parenteral (TROFA et al., 2008; ATAÍDES et al., 2012).

Segundo Arendrup e colaboradores (2014) relataram que *C. parapsilosis* apresenta-se, desde os anos 80, como um importante patógeno hospitalar de fungemias, sendo responsável por 7% a 15% das candidemias na maioria das séries publicadas nos EUA e Europa.

Sua ocorrência é maior em crianças e recém-nascidos prematuros internados em unidades de terapia intensiva, onde a prevalência de candidemias por *C. parapsilosis* é de 17 a 50% dos casos. Caracteristicamente, *C. parapsilosis* prolifera-se em soluções contendo glicose, tem grande capacidade de produzir biofilme e frequentemente coloniza a pele. Vários estudos estabelecem claramente uma associação entre a utilização de cateter venoso em posição central e maior ocorrência de fungemia por *C. parapsilosis*. Dessa forma, os isolados clínicos desta espécie são sensíveis a anfotericina B e aos triazólicos. Em países da América Latina *C. parapsilosis* tem sido reconhecida como a segunda principal causa de infecção invasiva em diferentes casuísticas já publicadas no nosso meio (KOC SUBÉ et al., 2007; GARCIA-EFFRON et al., 2009; ATAÍDES et al., 2012; NUCCI E COLS, 2013).

2.3 TERAPIA ANTIFÚNGICA

2.3.1 Antifúngicos convencionais

O antifúngico comercialmente disponível para infecções fúngicas do tipo invasivas foi a anfotericina B, durante décadas. Ainda, o medicamento possui uma relação com nefrotoxicidade e efeitos colaterais. Em busca de preparar novos fármacos, a primeira geração dos triazóis (fluconazol e itraconazol) modificou a epidemiologia das infecções fúngicas por *Candida* sp. e passou a disponibilizar novas alternativas de tratamento (MAYER et al. 2013; KOTACZKOWSKA, KOTACZKOWSKI 2016).

No tratamento de candidíases três classes de antifúngicos são empregadas. Com isso, três os poliênicos e os derivados azólicos tem como principal papel, de atuar na membrana fúngica. A classe das equinocandinas também é bastante utilizada no tratamento das candidíases, atuando no β -1,3 glucano que é um componente importante da parede celular (SANGLARD et al., 2009; BAILLY et al., 2015).

O tratamento nem sempre é eficaz devido ao aparecimento de resistência medicamentosa, principalmente resistências cruzada entre os triazóis, com isso, varias moléculas antifúngicas como fluconazol, cetoconazol, nistatina, anfotericina-B e 5-fluorocitosina, passaram a mostrar, desenvolvimento de resistência e toxicidade (ARAÚJO et al., 2005; NETT & ANDES, 2016).

A desigualdade dessa classe de fármacos é a formulação em formas parentral disponíveis, dessa mesma forma, se torna uma via de administração que causa grande desconforto para os pacientes. Diante disso, os isolados de *Candida* vêm desenvolvendo uma resistência adquirida frente às equinocandinas, contendo mudanças em regiões do sítio alvo em que o antifúngico atua (NEOFYTOS et al., 2010; KOTACZKOWSKA, KOTACZKOWSKI, 2016).

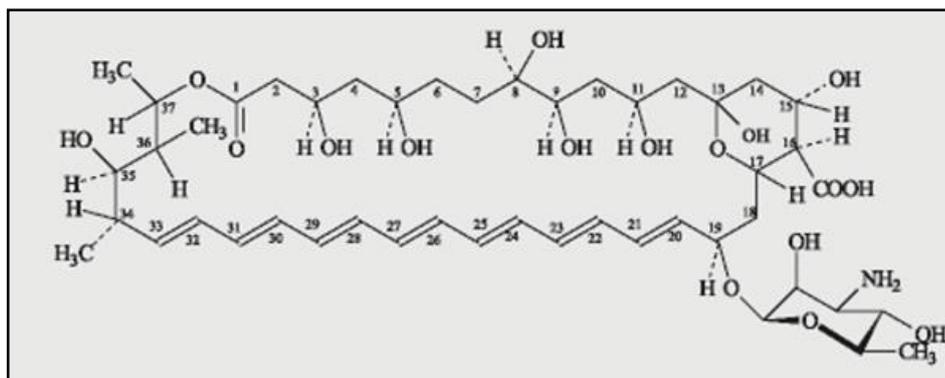
Alguns fármacos que são utilizados para o tratamento de candidíase podem mostrar efeitos diversos como interações medicamentosas e toxidade, pois algumas espécies de *Candida* vêm apresentando resistências especificam aos principais antifúngicos (ALVES et al., 2015; BAILLY et al. 2015)

2.3.2 Anfotericina b

O principal representante dos poliênicos é anfotericina B, produzido naturalmente a partir do actinomiceto *Streptomyces nodosuse* e disponibilizado a partir da década de 50, pois a anfotericina B apresenta um extenso espectro antifúngico e com uma boa eficiência, entretanto possui uma alta toxicidade, mesmo assim é a principal escolha para o tratamento de micoses sistêmicas relacionadas a pacientes imunocomprometidos (MARTINEZ, 2006; KATHIRAVAN et al., 2012).

A anfotericina B em sua forma composta por 37 carbonos, contendo um anel macrocíclico, possui número grande de átomos. Contem uma cadeia de hidratos de carbono unidos por duplas ligações, e uma oposta com sete grupos hidroxilos livres, oferecendo-lhe uma característica anfipática. A cadeia lateral é construída por um grupo de amino livre (Figura 1) (FILIPPIN, SOUZA 2006; BAILLY et al., 2015).

Figura 1– Estrutura química da anfotericina B.



Fonte: Filippin, Souza 2006.

A anfotericina B (AmB) é responsável por apresentar um mecanismo de ação relacionado a sua afinidade com esteróis. Embora apresente um grande espectro contra infecções fúngicas apresenta alta toxicidade, especialmente ao sistema renal, por causa disso, formulações lipídicas vêm sendo desenvolvidas como a *Ambisome*[®], uma formulação lipossomal da anfotericina B em qual o fármaco está fortemente associado com a estrutura em bicamada de pequenos lipossomas unilamelares (FALCI et al., 2015; GUERRA et al., 2007).

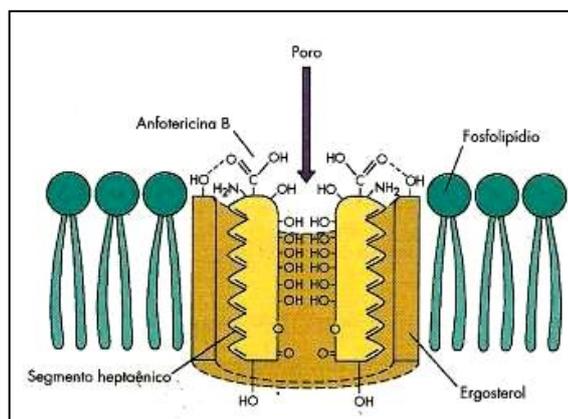
A indústria farmacêutica disponibiliza no mercado três formulações lipídicas: *Ambisome*[®] (anfotericina B lipossomal - L-AmB); *Abelcet*[®] compreende o complexo lipídico (ABLC); *Amphotec*[®] dispersão coloidal de anfotericina B (ABCD) (FALCI et al., 2015).

Anfotericina B pode ser aplicada em combinação com fluorocitosina, resultando em sinergismo e potencializando assim a ação do fármaco além de reduzir o tempo de tratamento da candidíase. No entanto, estudos ressaltam que fluorocitosina pode causar efeitos adversos como leucopenia em pacientes acometidos com HIV (BENDAHA et al., 2011; NETT, ANDES, 2016).

Embora as espécies de *Candida* se apresentem como leveduras não capsuladas a anfotericina B apresenta à capacidade de se tocar a morfologia da cápsula de mucopolissacarídeos, trazendo um mecanismo de ação mais eficiente para o tratamento (BAILLY et al., 2015).

O procedimento de ação *in vivo* de anfotericina B é fundamentado na ligação com o ergosterol, componente presente na membrana celular dos fungos, que leva à construção de canais transmembranares, e acarreta desequilíbrio iônico dos cátions presentes e conduz a célula à morte (Figura2) (BAGINSKI et al.,2005; ARENDRUP, 2013).

Figura 2– Mecanismo de ação da anfotericina.



Fonte: Murray et al., 2007

Embora estudos tenham demonstrado que espécies de *Candida* possam apresentar resistência a este fármaco, o mesmo ainda é fundamental na terapia da candidíase disseminada, doença fúngica responsável por altos índices de mortalidade e morbidade em todo o mundo (ARENDRUP, 2013; BITAR et al., 2014).

2.3.3 Fluconazol

O fluconazol é um fármaco sintético produzido a partir da substituição do anel imidazólico por um triazólico, altamente utilizado no tratamento de micoses profundas e mucocutâneas de uma forma isolada ou em combinação. O fluconazol apresenta seletividade para o citocromo P450, que é responsável pela ativação de fármacos ou toxinas presente na célula fúngica e possui um extenso espectro de ação frente a espécies de *Candida* sp. (FAVALESSA et al., 2009; NETT & ANDES, 2016).

O mecanismo de ação do fluconazol é fundamentado na inibição de parte do complexo P450 especificamente na C-14- α -desmetilase, elementos necessários para a síntese do ergosterol presente na membrana das células fúngicas, sendo ativos em fungos leveduriformes. Devido ao sítio de ação no complexo P450, o fluconazol também pode apresentar efeito sobre este complexo em humanos, podendo levar a interações medicamentosas e diversos efeitos secundários desfavoráveis (WANG et al., 2009; BENDAHA et al., 2011).

A grande disponibilidade do fluconazol está relacionada à administração por via oral, podendo atingir o plasma em uma concentração maior ou idêntica a 80% em comparação a administração por via endovenosa (Kathiravan et al., 2012).

De acordo com Bailly et al. e colaboradores (2015) isolados clínicos de espécies de *Candida* demonstraram resistência a anfotericina B, flucitosina, fluconazol, Itraconazol, antes ou durante

o tratamento, devido a seleção de clones resistentes induzida pela longa exposição ao mesmo. Nessa situação a utilização de compostos de plantas medicinais podem se tornar, opções de tratamento das infecções causadas por *Candida* que apresentem boa resposta terapêutica e de uma forma que cause menos danos ao hospedeiro.

A equinocandinas é uma classe de antifúngicos que possui grupos volumosos, semi-sintéticos, composto peptídico cíclicos (hexapeptídicos), possuindo um N ligado ao lado acil lipídico, porém com hidroxilação diferente; seu mecanismo geral de ação é a inibição não competitiva da β -(1,3)-D-glucano sintase, enzima esta responsável pela síntese da parede celular de fungos que é composta de um complexo de proteínas e polícarboidratos (PFALLER, 2011).

Devido ao seu mecanismo de ação, as equinocandinas demonstram um excelente espectro de ação e potência. Por possuírem meia-vida longa, as drogas desta classe podem ser administradas uma vez ao dia, e ao contrário dos azóis não são metabolizadas pelo citocromo P-450, logo há mínima ou nenhuma interação droga-droga, sendo bem toleradas com poucos efeitos colaterais devido a sua especificidade de ação na célula fúngica CHAKRABARTI, 2009; TESTONI et AL., 2012).

A pesar de quer os testes de susceptibilidade *in vitro* não estejam totalmente padronizados, estas drogas são consideradas como fungicida para a maioria das espécies de *Candida*, incluindo espécies resistentes à azólicos, e *C. lusitaniae* resistente à anfotericina B apresenta sensibilidade aceitável (PFALLER, 2012).

2.4 PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais são utilizados por décadas pela população com efeito terapêutica. Esse interesse pela utilização de medicamentos fitoterápicos surgiu pela crença popular em que substâncias obtidas de plantas medicinais, possuem eficácia quando a medicina tradicional não alcança os resultados esperados (SANTOS et al., 2010; PETROVSKA, 2012).

As plantas medicinais vêm se destacando por possuir muitos constituintes e metabólitos secundários que mostram atividade contra inúmeras enfermidades, incluindo doenças infecciosas. Produtos medicinais a partir de plantas eram mais freqüentemente usadas em populações carentes de áreas rurais e urbanas, por apresentar uma disponibilidade com menores custos, esses componentes já são isolados e são utilizados nas formulações medicamentosas para o controle de infecções fúngicas (JESUS, 2009; MOGHADAMTOUSI et al., 2014).

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas em diversos países em desenvolvimento, como único recurso terapêutico disponível para problemas de saúde pública. Com isso, nos últimos anos produtos de origem vegetal vem sendo estudado com uma atenção especial, pois representam uma prática bastante apresentada na medicina tradicional e que retrata inúmeros relatos de eficiência terapêutica (SILVA et al., 2009; COSTA et al., 2014).

Nos dias atuais os produtos naturais representam uma ampla e rica fonte de potentes compostos bioativos com várias composições moleculares, as quais constituem mais de 30% dos produtos disponíveis pela indústria farmacêutica. A capacidade antimicrobiana dos compostos, diferentes fragmentos e extratos isolados de diferentes partes das plantas capaz de controlar a multiplicação de uma ou mais espécies de microrganismos vem sendo instrumento de estudos de várias pesquisas (GOULART et al., 2013; FERREIRA et al., 2013; COSTA et al., 2014; BALDWIN et al., 2015; REIS et al., 2016).

Os atributos terapêuticos encontrados em plantas utilizadas na medicina popular confirmam que a biodiversidade vegetal apresenta vários compostos bioativos que são grandes promissores na produção de novos fármacos (MORAIS-BRAGA et al., 2013). Diante disso, esse potencial vem apresentando como uma grande alternativa promissora no combate às infecções fúngicas (SANTOS et al., 2010).

Os compostos retirados dos vegetais são divididos em dois grupos: metabólitos primários e metabólitos secundários. Os primários possuem proteínas, carboidratos, lipídeos e aminoácidos e são iniciadores para a produção dos metabólitos secundários formado por compostos fenólicos, óleos essenciais, flavonóides (ALBUQUERQUE, HANAZAKI 2006; BALDWIN et al., 2015; KUMAR et al. 2015).

Mesmo tendo uma grande biodiversidade de plantas medicinais no mundo, ainda poucos estudos são conduzidos à nova descoberta de compostos bioativos com propriedades farmacêuticas, que poderiam proporcionar novos produtos químicos para a descoberta de novas drogas e com diferentes alternativas terapêuticas. Compostos de plantas medicinais têm mostrado potenciais significativos e no tratamento de infecções fúngicas (LIMA et al., 2006; DZOYEM et al., 2013; NEWMAN CRAGG, 2010).

Os produtos naturais possuem grande parte dos componentes responsável à formulação de novos fármacos, com grande potencial para uma importante variedade de doenças que acometem os humanos. Mesmo sabendo a dimensão de países e a diversidade de espécies vegetal, podemos afirmar que possui uma lacuna quando se trata de pesquisas em plantas medicinais. Atualmente a maioria desses produtos que estão em pesquisas para o

desenvolvimento de fármacos são provenientes de plantas medicinais ou fontes microbianas (COSTA et al., 2014; DZIALO et al., 2016; DZOYEM et al., 2013).

2.4.1 Compostos fenólicos

Vários estudos epidemiológicos, *in vitro* e *in vivo* comprovaram as inúmeras vantagens dos compostos fenólicos presentes em vegetais, frutas, legumes e verduras. Tais competências são atribuídas aos múltiplos efeitos biológicos comparados aos compostos, tais como atividades antimicrobiana, anti-inflamatória e prevenção de doenças crônicas como câncer e doenças cardiovasculares (JANIQUEES et al., 2013; KAJAL et al., 2014; VERMA et al., 2014).

Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, são essenciais para o crescimento e reprodução, tem como o principal papel de proteger os vegetais de estresses ambientais, qualquer tipo de infecções, radiação ultravioleta e ferimentos. Dessa forma, os compostos fenólicos (ferúlico, cinâmico e vanílico) de vegetais apresentam efeitos inibitórios na produção de micotoxinas e crescimento de fungos (ANGELO, JORGE 2007; KAJAL et al., 2014; SOUZA et al., 2010).

O maior grupo de bioativos presentes em vegetais é composto por substâncias fenólicas, pois há cerca de cinco mil fenóis de estrutura versátil com polivalência, distribuídos em classes a partir de suas estruturas químicas. Esses compostos possuem um anel aromático existente em sua estrutura podendo ter um ou mais substituintes hidroxílicos (JANIQUEES et al., 2013; SAEED et al., 2016).

Os principais grupos fenóis são os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis. A diversidade de combinações possíveis que apresentam na natureza leva a uma variedade estrutural muito grande dos fenóis os quais são chamados de polifenóis. Os compostos fenólicos são divididos em dois grupos os flavonóides e não flavonóides, porém ambos apresentam baixo peso molecular, formado de metabólitos secundários (FALLER, FIALHO, 2009; SUN et al., 2012; VOLP et al., 2008).

Segundo Reis et al., (2016) os compostos fenólicos são substâncias relevantes que servem para mecanismos de defesa da planta contra fungos, bactérias, vírus, parasitas, insetos, moluscos e animais superiores, podendo servir de antifúngico e antibacteriano. Esses fenóis que geralmente são encontrados na natureza estão presentes nos vegetais, entre esses fenóis, os mais pesquisados são os flavonóides, ácidos fenólicos e cumarinas, sendo classificados de acordo com o número de carbono presente em sua estrutura estruturas Tabela 1 (ANGELO, JORGE 2007; BALDWIN et al., 2015).

Tabela 1– Classe de compostos fenólicos encontrados em plantas, de acordo com suas estruturas químicas.

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas	C6
Ácidos hidroxibenzóicos	C6–C1
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	C6–C2
Ácidos hidroxicinâmicos,	C6–C3
Nafitoquinonas	C6–C4
Xantonas	C6–C1–C6
Estilbenos, antoquinonas	C6–C2–C6
Flavonóides, isoflavonóides	C6–C3–C6
Lignanas, neolignanas	(C6–C3)2
Biflavonóides	(C6–C3–C6)2
Ligninas	(C6–C3) <i>n</i>
Taninos condensados	(C6–C3–C6) <i>n</i>

Fonte: Angelo, Jorge 2007.

Segundo Chen et al. (2016) estudos sobre atividades antimicrobianas de vegetais ricos em fenóis vem sendo desenvolvido com o passar dos anos, relatando atividade antifúngica *in vitro* de plantas medicinais utilizando ensaio de microdiluição em caldo, frente a espécies de *Candida*.

A atividade antimicrobiana de vegetais ricos em fenóis recentemente publicadas por Ghosh et al. (2015) relataram atividade antifúngica *in vivo* de *Curcuma longa Linn* utilizando ensaio de microdiluição em caldo, frente a cepas de *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, apresentando atividade, frente aos microorganismos testados. Efeitos genotóxicos foram avaliados em células leucocitárias humanas e os compostos obtidos de *Curcuma longa Linn* não apresentou atividade genotóxica (GUPTA et al., 2012).

Dulgeret al. (2014) descreveram atividade antifúngica da *Hypericum havvae*, planta utilizada na medicina popular apresentando bons resultados para concentrar compostos fenólicos, frente às espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. neoformans* e *C. laurentii*, por método de microdiluição em caldo. Com os valores das concentrações inibitórias variaram de 3,12 a 2.500 µg.mL⁻¹. Concentrações inibitórias mínimas, foram observadas frente à *C. albicans* e *C. laurentii*, os quais apresentaram 1,56 µg.mL⁻¹.

Estudo realizado por Alves et al. (2014) avaliou a capacidade antifúngica dos compostos fenólicos ácido gálico, catequina, luteolina e quercetina frente a biofilmes de espécies de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. A CIM variou de 0,156 a 1,250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para todos os compostos testados. Entre os compostos utilizados o ácido gálico apresentando o melhor resultado $\text{CIM} < 0,156 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Souza et al. (2010) avaliaram a atividade antifúngica de extratos fenólicos da cebola, farelo de arroz e microalga *Chlorella phyrenoidosa* frente ao fungo *Rhizopus oryzae*, por método de microdiluição. Relatando que o extrato aquoso da cebola e metanólico de *Chlorella phyrenoidosa* não apresentaram atividade inibitória ao crescimento fúngico. Porém os extratos acetato etílicos da cebola e metanólico de farelo de arroz apresentaram atividade antifúngica com CIM 2,6-86 e 46 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente.

Silva Filho et al. (2008) relataram que em teste de microdiluição, seguindo a metodologia CLSI, atividade antifúngica do extrato de folhas de *Baccharis dracunculifolia* contra *Candida* e *Cryptococcus* apresentando valores de CIM 65 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente.

Os compostos fenólicos colaboram para o sabor, odor e coloração de diversos vegetais, diante disso, possui uma grande importância como flavorizantes, corantes de alimentos e bebidas. Esses compostos estão associados com atividade antimicrobiana, antioxidante, antiparasitária, anticonvulsiva, analgésica, anti-inflamatória e antitumorais (KAJAL et al., 2014; VERMA et al., 2014).

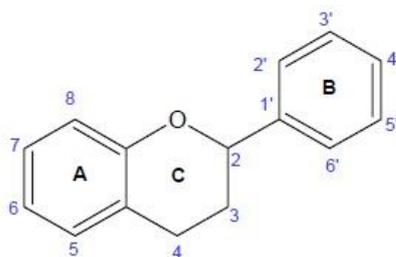
2.4.2 Flavonóides

Entre os polifenóis amplamente distribuídos no reino vegetal os flavonóides estão entre os mais presentes, encontrados freqüentemente em frutas e sementes, podendo também estar em forma de glicosídeos ou gliconas. O organismo humano não produz flavonóides, mas estas estruturas químicas são obtidas em alimentação a base de vegetais. Esse composto possui atividades antioxidantes, anti-inflamatórias antipiréticas comprovadas (PASSONE & ETCHEVERRY, 2014; ANGELO, JORGE 2007).

Nos vegetais, os flavonóides além de serem encontrados em grande quantidade também apresentam importantes funções, entre elas, à proteção contra estresses ambientais como radiação ultravioleta, atividade antimicrobiana, ação antioxidante e inibição enzimática. Os flavonóides estruturalmente apresentam baixo peso molecular, constituídos estruturalmente por 15 átomos de carbono C6–C3–C6 e em cada uma das duas partes da molécula com seis carbonos

são estruturadas por anéis aromáticos, como mostra a Figura 3 (MARTÍNES-FLÓRES et al., 2002; MENDES et al., 2015).

Figura 3 – Estrutura química básica dos flavonoides.



Fonte: Machado et al., (2008)

Gerados a partir do metabolismo secundário dos vegetais, a família dos flavanóides, apresentam em torno de 8000 componentes. Os compostos são geralmente encontrados em caule, raízes, flores, cascas de arvores, frutos e sementes (SUN et al., 2012; KUMAR et al. 2015).

De acordo Peterson et al., (1998) as propriedades farmacológicas que são apresentadas pelos flavonóides certificam a eles a capacidade de atuarem em elementos biológicos, com pouca ou nenhuma toxicidade, colaborando positivamente para a saúde humana. Apresentando uma grande diversidade de ações, pois são um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural (KAJAL et al., 2014; ORHAN et al., 2010).

Coelho et al. (2012) descreveram por meio do teste de microdiluição em caldo a capacidade antimicrobiana do extrato metanólico da *Chamomilla recutita* L., planta medicinal que apresenta compostos fenólicos da classe dos flavonóides, contra isolados de microorganismos: *C. neoformans* (CIM = 0,156128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), *C. albicans* (CIM = 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e *Staphylococcus aureus* (CIM=5128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Dzoyem et al. (2013) relataram atividade antimicrobiana de flavonóides presentes em espécies de *Dorstenia* por método de microdiluição. A CIM determinada para *S. aureus* variou de 0,5-128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e para *Candida* ficou entre 64-128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A concentração inibitória mais significativa foi frente a *Cryptococcus* (0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), similar a CIM da anfotericina B (0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) frente ao mesmo isolado. Chen et al. (2016) relataram atividade antifúngica do composto curcumina contra espécies de *Candida* 32-128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, *C. neoformans* 128-256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, *Aspergillus* spp 64-512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e *Sporothrix schenckii* 64-256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

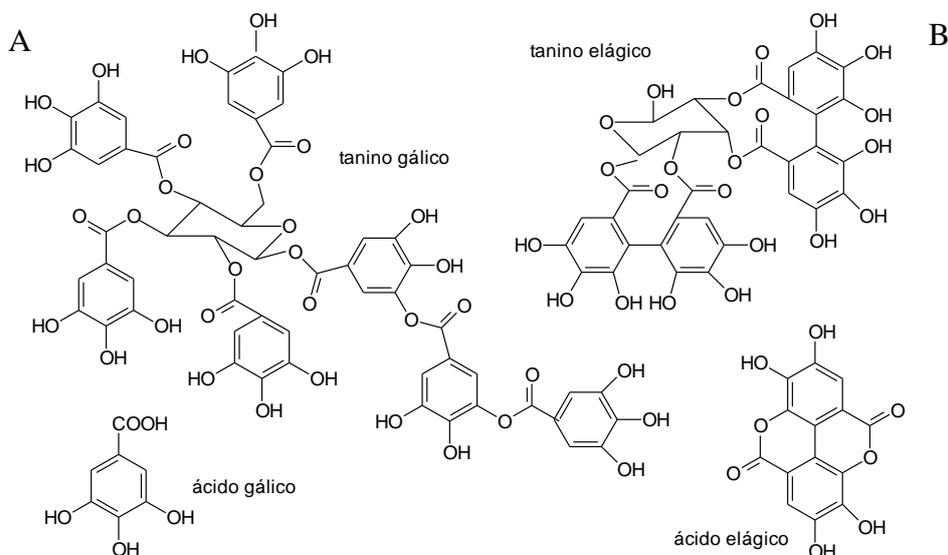
2.4.3 Taninos

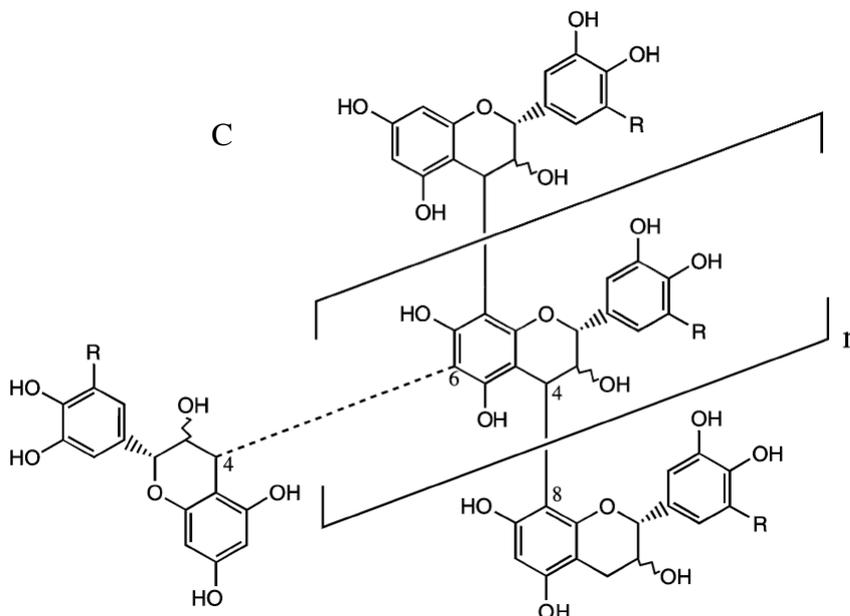
Compostos fenólicos do metabolismo secundário vegetal, os taninos apresentam peso molecular em cerca de 500 a 3000 Dalton. São responsáveis pela adstringência de grande parte dos frutos e produtos vegetais. As utilizações de drogas baseadas em taninos estão diretamente relacionadas à capacidade adstringente (DZIALO et al., 2016; MONTEIRO et al., 2005).

Segundo Monteiro et al. (2005) os taninos apresentam atividades biológicas em humanos como antidiarréico, antisséptico, antibacteriano e antifúngico, também podendo auxiliar na formação de camada protetora em tecidos epiteliais inflamados com feridas, queimaduras e inflamações. O equilíbrio da estrutura química e composição são essenciais para a caracterização biológica (OKUDA, ITO 2011).

Apesar de serem produtos naturais de plantas, os taninos tem a competência de precipitar proteínas solúveis em água podendo adquirir toxicidade frente a organismos biológicos. Taninos podem ser classificados em dois grupos: hidrolisáveis, que compreendem ésteres dos ácidos gálico e elágico (figura 4A e 4B); e, os taninos condensados (Figura 4C) sendo esses polímeros como o flavan 3,4-diol (KHANBABAEI, REE 2001; KUMAR et al., 2015; SIMÕES et al., 2017).

Figura 4 – Taninos: hidrolisáveis (A/B) e condensados (C).





Fonte: Simões et al., 2017.

Goulart et al., (2013) relataram a ação antifúngica através do método de microdiluição em caldo de extratos de *Agonandra brasiliensis* Miers ex Benth., vegetal comum do Cerrado brasileiro, frente a espécies de *Candida* e *Cryptococcus*. O extrato hidrometanólico apresentou CIM de $300\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* e *C. neoformans*, contra *C. gattii* a CIM foi determinada em $600\mu\text{g.mL}^{-1}$. As frações hexânicas para *C. tropicalis* e *C. dubliniensis* apresentaram CIM de $150\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *C. krusei* e *C. parapsilosis* as concentrações inibitórias mínimas foram determinadas em $600\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $300\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente. A fração hidrometanólica foi ativa sobre *C. krusei* e *C. tropicalis* em uma CIM de $300\mu\text{g.mL}^{-1}$.

A atividade antifúngica do composto curcumina já foi descrita contra espécies de *Candida* e *Cryptococcus* Kumar et al.(2014). Além disso, esse constituinte apresenta efeitos contra doenças crônicas, diabetes mellitus, alergias, doença de Alzheimer e apresenta boa tolerabilidade e baixa toxicidade (GHOSH et al., 2015).

Segundo Dzialo e colaboradores (2016) relataram avanços no desenvolvimento de medicamentos modelagem molecular, química combinatória e sintética, naturais compostos derivados de plantas ainda estão provando ser uma inestimável fonte de medicamentos para humanos.

2.4.4 Espécies vegetais

O Nordeste brasileiro sempre foi destaque nacional em relação à variedade de plantas medicinais, entretanto, sendo considerado um dos centros mundiais de biodiversidade, onde os vegetais são utilizados popularmente por comunidades tradicionais e atuais para o tratamento de inúmeros processos patológicos (BAPTISTEL et al., 2014; SOUZA et al., 2012).

Barbosa Junior et al. (2015) classificaram por meio da técnica de difusão em disco a atividade antifúngica de extratos de plantas medicinais popularmente utilizadas no Nordeste e especialmente por comunidades do sertão Sergipano: *Ziziphus joazeiro*, *Caesalpinia pyramidalis*, *Bumelia sartorum*, *Hymenaea courbaril*. Todos os extratos testados com concentrações de 4 a 100 mg.mL⁻¹ apresentaram ação antifúngica em todas as linhagens clínicas de *Cryptococcus*.

Ferreira et al. (2013) relataram atividade antifúngica *in vitro* por método de microdiluição de dez espécies de plantas utilizadas tradicionalmente no nordeste brasileiro: *E. uniflora*, *C. ferrea*, *P. guajav*, *P. americana*, *S. terebinthifolius*, *M. ophthalmocentra*, *P. rigida*, *Hymenaea stigonocarpa*, *M. tenuiflora*. Em isolados de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. Os melhores resultados para inibição fúngica foram apresentados a partir dos extratos de *E. uniflora* (CIM= 15,62 µg.mL⁻¹) e extratos de *C. ferrea* e *P. guajava* com CIM variando de 15,62 a 250µg.mL⁻¹ contra as espécies de *C. glabrata* e *C. krusei*.

Johann et al. (2007) comprovaram por método de microdiluição a ação antifúngica de oito plantas tradicionalmente usadas na medicina popular brasileira: *Ingadulcis* (Vell.) Mart., *S. terebinthifolius* Raddi, *Althernanthera brasiliiana* Kuntze., *Piper regnellii* CDC., *Herissantia crispa* L. Briz., *Rubus urticaefolius* P., *Rumex acetosa* L., *Baccharis dracunculifolia* DC., frente a isolados de espécies *Cryptococcuse Candida*.

2.4.4.1 Anadenanthera colubrina (Vell)

Espécie de planta encontrada no Nordeste do Brasil, a *A. colubrin* apertencente à família Fabaceae, popularmente é conhecida como angico e apresenta atividades como antisséptico através do uso de suas cascas sob a forma de chá, apresenta grande importância econômica, social e ambiental, além de ser muito utilizada na recuperação e restauração de áreas e florestas degradadas por apresentar boa regeneração natural. Além disso, é um vegetal rico em taninos com propriedades medicinais (LAMBRECHT et al., 2015; MEYER et al., 2015; MONDO et al., 2008).

A *A.colubrina* é empregada no tratamento de cicatrização de feridas com um processo dinâmico no qual a interação entre mediadores, células sanguíneas e matriz extracelular leva regeneração da superfície interna ou externa do corpo, essa fase seguinte de reparação compreende a formação de granulação tecido pelo surgimento de capilares e fibroblastos (SANTOS et al., 2014).

De acordo com Lima e colaboradores (2015) realizaram pesquisa com extrato bruto de *A.colubrina*, onde relataram que o extrato do vegetal apresenta atividade antifúngica contra *C. albicans*, esse mesmo extrato também foi testado em células tumorais humanas, apresentando um resultado na diminuição do crescimento, dessas células tumorais humana.

Ferreira et al. (2013) apresentaram estudos comprovando *in vitro* a atividade antifúngica de extratos de *A. colubrina*, por método de microdiluição em caldo frente a espécies de *C. albicans* (CIM=31,25-1000 $\mu\text{l.mL}^{-1}$), *C. dubliniensis* (CIM=250 $\mu\text{l.mL}^{-1}$), *C. glabrata*(CIM=62,50 $\mu\text{l.mL}^{-1}$) e *C. krusei* (CIM=62,50 $\mu\text{l.mL}^{-1}$).

2.4.1.2 Eugeniauniflora L.

Popularmente conhecida como pitangueira, a *E.uniflora*, é uma espécie de planta pertencente à família Myrtaceae, nativa da mata atlântica brasileira bastante utilizada no Brasil principalmente na Região Nordeste. Pesquisas comprovam que a planta apresenta atividade antimicrobiana, assim como outras diversas ações na medicina popular. *E.uniflora* é utilizada para o tratamento de diarreia, dor de estômago, cólicas, infecção intestinal, verminose, febre, gripe, tosse, bronquite, ansiedade, hipertensão arterial e diabetes (BRUN, 2010; RAMALINGUM e MAHOMOODALLY, 2014; FALCÃO et al., 2018).

Independentemente de ter a *E.uniflora* investigação química pouco estudada, sabe-se possui que diversos compostos fenólicos com ações antioxidantes, hipoglicemiantes, antirreumática, antidiarréica, e capacidade de regular a pressão articular. Dessa forma, esta planta foi inserida nas indústrias alimentícias, cosméticas e medicinais (ALMEIDA et al., 2012; RATTMANN et al., 2012).

Schumacher e colaboradores (2015) relataram que a folha da *E. uniflora* reduzem o índice de infiltrado inflamatório em ilhotas pancreáticas, mantendo níveis séricos de insulina e glutatona hepática, reduzindo a peroxidação lipídica sérica, bem como diminuindo o risco de diabetes em camundongos diabéticos não obesos.

A caracterização físico-química de *E. uniflora* apresenta inúmeras quantidades de compostos fenólicos, os quais estão diretamente ligados a sua capacidade antioxidante e os tipos

de coloração que o fruto apresenta. As folhas de *E. uniflora* contêm alcalóides, triterpenos, taninos, flavonóides e antraquinonas (BAGETTI et al., 2011; SANTANA et al., 2016).

Bezerra et al. (2012) relataram a ação antimicrobiana por método de disco difusão em ágar, de extratos hidroalcoólico de *E. uniflora* L., frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*. A atividade antibacteriana foi confirmada contra *S. aureus* e *P. Aeruginosa* com diâmetro dos halos de inibição variando de 13,14 a 11,07mm, e 16,11 a 11,59mm, respectivamente.

Lago et al. (2011) apresentaram atividade antifúngica pelo teste de microdiluição a partir de óleos essenciais de *E. uniflora* L., contra leveduras do gênero *Candida* e *Cryptococcus* apresentando CIM variando entre 0,11 a 3,75mg.mL⁻¹. O uso medicinal de muitas de suas espécies vem sendo confirmada por apresentar grande atividade microbiana, principalmente em espécies de *Candida* (SILVA-ROCHA et al., 2017).

Atividade contra bactérias foi demonstrado por Oliveira et al., (2008) avaliando pelo método de difusão em meio sólido a partir de extratos hidroalcoólicos obtidos do fruto da *E. uniflora*. Os resultados demonstraram halos de inibição frente cepas de *Streptococcus mutans* de 11,0 a 16,0mm, *Streptococcus sanguis* (7-17mm), *Streptococcus salivarius* (12-17mm), *Streptococcus mitis* (12mm) e *Streptococcus oralis* (10-22mm). Segundo Pedro e colaboradores (2017) relataram que a *E. uniflora* podem ser alternativas para diferentes tratamentos e reduzir os possíveis efeitos colaterais quando comparado com antibióticos.

2.4.4.3 *Libidibia ferrea* (Mart)

Popularmente conhecida com “jucá” ou “pau ferro”, a *Libidibia ferrea* é uma planta encontrada em biomas de Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, mas que desenvolve em todo o Brasil, especialmente no Norte e Nordeste. Largamente utilizada na medicina popular por apresentar inúmeras propriedades terapêuticas como ação anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana e antitérmica (FREITAS et al., 2012; VENÂNCIO et al., 2015).

Kobayashi et al. (2015) apresentaram estudos fitoquímicos da *L. férrea* encontrando a presença de saponinas, ácidos orgânicos, açúcares redutores, compostos fenólicos e taninos.

A presença de vários compostos presentes do extrato hidroalcoólico da casca, caule e folhas os quais apresentaram a presença de flavonóides, saponinas, taninos, cumarinas, esteróis, compostos fenólicos e ácidos gálico como seus principais constituintes, os quais são responsáveis por muitas das atividades farmacológicas (COSTA et al., 2015).

De acordo com Venâncio et al. (2015) a *L. ferrea* apresenta uma atividade antimicrobiana promissora frente os micro-organismos presentes na cavidade oral e contra a formação de biofilmes, além de não mostra atividade citotóxica significativa em testes com linhagens de células.

Oliveira et al. (2013) relataram através da técnica de difusão em ágar demonstraram atividade antimicrobiana de extratos de *L. ferrea* frente *S. mutans*, *Streptococcus oralis*, *Lactobacillus casei* e *C. albicans*, patógenos da cavidade oral. Os resultados demonstraram valores de CIM para *L. casei* e *S. oralis* de 9,3 mg.mL⁻¹, para *S. mutans* a CIM foi determinada em 18,6mg.mL⁻¹. Contra *C. albicans* a inibição foi observada em uma concentração de 18,7 mg.mL⁻¹.

Marreiro et al. (2014) apresentaram análise microbiológica e verificaram que não existia presença de contaminantes tais como *S. aureus*, *P. aeruginosa*, fungos filamentosos, leveduras e coliformes em extratos de *Libidibia férrea*, relataram também a atividade antibacteriana pela técnica de microdiluição frente a cepas de *S. mutans* e *S. oralis*, com valores de inibição variando de 100 a 3.125µl.mL⁻¹.

Segundo Guerra e colaboradores (2017) relataram a *L. ferrea* possui efeito antioxidante, peroxidação lipídica e efeitos quimioprotetores em células saudáveis. Assim, os derivados de *L. ferrea* têm efeitos anticancerígenos importantes e podem ser considerados candidatos promissores para a terapia do câncer colorretal.

2.4.4.4 Schinus terebinthifolius Raddi

Planta medicinal nativa do Brasil, conhecida popularmente como aroeira-vermelha, a *S. terebinthifolius* Raddi pertencente da família Anacardiaceae e possui propriedades medicinais e alimentícias. Tradicionalmente é utilizada para tratamento de diversas infecções, entre elas as do sistema genital feminino, por apresentar características anti-inflamatórias e cicatrizantes. Possui ação no tratamento de vaginites crônicas e cervicites. No entanto, estudos relatam que esta planta pode produzir resinas que em contato com a pele podem causar dermatite alérgica (LIMA et al., 2006; SARTORELLI et al., 2012; AZEVEDO et al., 2015).

Segundo Di Ciaula et al. (2014) *S. terebinthifolius* vêm demonstrando propriedade medicinais constatadas como anti-sépticas e anti-inflamatórias eficazes nos quadros febris, em infecções do trato urinário, diarreias, tosse, bronquite e outras alterações do sistema respiratório. Cada vez mais vem crescendo o interesse da indústria farmacêutica nos compostos presentes nessa espécie vegetal, atualmente já existe no mercado um medicamento a base de taninos

extraídos de *S. terebinthifolius*, chamado Kronel, indicado como cicatrizante e para uso ginecológico (GREATTI et al., 2014).

Oliveira Junior et al. (2013) a ação antifúngica extratos de *S. terebinthifolius* são bastantes discutidos para várias espécies, como *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. neoformans* e *Sporothrix schenckii*. As cascas do caule possuem uma grande riqueza de taninos, que conferem uma ação adstringente, desinfectante, com pH podendo chegar a 6,5, auxiliando na medicina popular no tratamento de gastrite (SANTOS et al., 2006).

Pesquisas dos componentes químicos presentes na aroeira revelaram diversos e numerosos compostos bioativos, tanto em óleos essenciais quanto em extratos, os quais apresentam inúmeras propriedades farmacêuticas. Entre os compostos encontrados e descritos na literatura, destacam-se os principais fenólicos, flavonóides, taninos, ácido gálico, terpenóides, ácidos graxos, fenóis triterpenos, xantones e esteróides livres (CARVALHO et al., 2013; LIMA, 2009).

Torres et al. (2016) apresentaram por meio de método de disco difusão atividade antifúngica de *S. terebinthifolius* frente a *C. albicans* e *C. tropicalis* com halos de inibição ≤ 16 mm, e *C. krusei* apresentando halos de inibição ≤ 14 mm.

Pesquisas *in vivo* em ratos *Wistar* da genotoxicidade de extrato aquoso de *S. terebinthifolius* através da frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos indicam que os mesmos não apresentam efeitos genotóxicos, pois apenas um discreto aumento no número de eritrócitos policromáticos e normocromáticos (TERRA JUNIOR et al., 2015).

De acordo com Ghanney, Rhouma (2015) descreveram extratos obtidos da folha de *S. terebinthifolius* apresentaram ação antibacteriana contra *Agrobacterium tumefaciens*, espécies patogênicas de plantas. Os resultados apresentaram halos de inibição ≥ 7 mm pelo método de disco difusão em ágar.

Por método de difusão em ágar que *S. aureus* apresenta susceptibilidade ao extrato hidroalcolico de *S. terebinthifolius* formando zonas de inibição com halos de 8mm de diâmetro em concentrações inibitorias mínimas de até 35,3mg/mL (SÁ et al., 2014).

Segundo Costa et al. (2013) extratos etanólicos *S. terebinthifolius* avaliados por método de difusão em ágar apresentam atividade antimicrobiana frente à *Enterococcus faecalis* e *S. aureus* com a formação de halos de inibição de 8 e 12 mm respectivamente.

Atividade inibitória *in vitro* de extratos obtidos de *S. terebinthifolius* contra cinco diferentes cepas de *Paracoccidioides brasiliensis*, pelo método de microdiluição em caldo, foram apresentadas por Johann et al., (2010). Nesse estudo, as CIM do extrato frente ao fungo dimórfico foram de 7,5 a 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

De acordo com Freire et al. (2010) pesquisaram em *in vitro* por método de difusão em Agar, relataram que bactérias das espécies *S.mutans*, *Lactobacillus casei*, formadoras do biofilme dentário, são susceptíveis à ação antibacteriana de *S. terebinthifolius*. Nesse estudo, as CIM foi de 3,125 mg/mL para *S. mutans* e 1,562 mg.mL⁻¹ para *L. casei*.

Ação cicatrizante do extrato de aroeira foi avaliada *in vivo* em cicatrizações de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos. Demonstrou-se que o extrato apresenta efeito cicatrizante favorável nas cobaias (LUCENA et al., 2006; NOCCHIN, 2016).

2.4.4.5 Psidium guajava L

A espécie *P. guajava*, comumente conhecida como goiabeira, tem sido muito utilizada na medicina popular em varias partes do mundo (BARBALHO et al., 2012). Extratos e metabolitos desta planta, particularmente os obtidos de folhas e frutos, possuem atividades biológicas relevantes tais como antimicrobiana, presente no tratamento da diarreia, anti-inflamatória e atividade antioxidante (GUTIÉRREZ et al.,2008).

2.4.4.6 Persea americana Mill

A *P. americana* conhecida popularmente como abacate, possui apreciáveis qualidades nutricionais, sendo ricas em lipídios insaturados, vitaminas e fibras. No mercado atual, têm sido valorizadas as variedades de calibres menores, como a Hass. Trata-se de um fruto climatérico e sua alta perecibilidade representa um entrave à comercialização (DAIUTO et al., 2010). A alta perecibilidade dos frutos, devido à continuidade dos processos metabólicos na fase pós-colheita, juntamente com procedimentos inadequados aplicados à colheita, assim como ao transporte e armazenamento são os principais fatores responsáveis pelo comprometimento da qualidade (CARVALHO et al., 2006). O tratamento térmico tem sido utilizado em pós colheita para resolver o problema de contaminação de doenças fúngicas e infestação de insetos em frutos (COUEY, 1989; MOHAMMAD, 2010).

Segundo Brai et al. (2014) relataram que a *P. americana* eduziria o acúmulo de lipídios hepáticos na doença hepática gordurosa e melhoraria a lesão hepática. A *P.americana* não apresenta toxicidade, com isso pode ser utilizadas para diversos tratamentos (OBOH et al., 2016).

A *P. americana* possui propriedades para redução significativade edema, atividade antiinflamatória, controlar o niveis de glicose, diminuindo o nivel do colesterol (LDL) o ruim (LIMA et al., 2012; BRAI et al., 2014)

2.4.4.7 *Mimosa ophthalmocentra* Mart.

Segundo Lemos e colaboradores (2010) relataram gênero *M. ophthalmocentra* estabeleceram um tema relevante para estudo por apresentar muitos problemas taxonômicos a serem resolvidos, dessa forma, ocorre em face de sua complexidade, relacionada à ampla distribuição geográfica e aos diferentes tipos de habitat em que ocorre, diante do seu elevado número de táxons. *M. ophthalmocentra* Mart. ex Benth. é frequentemente confundida devido a sua semelhança com *M. arenosa* (Willd.) Poir. e *M. tenuiflora* (Willd.) Visto que, sua ocorrência exclusiva do Brasil, especialmente no Distrito Federal, Bahia, Rio Grande do Norte e Pernambuco, em áreas de catinga e cerrado. Trata-se de uma espécie da família Fabaceae, conhecida popularmente como jurema de embira, jurema vermelha. Existem apenas relatos populares indicando o uso de suas cascas para tratamento de tosse e bronquite, utilizando um extrato aquoso obtido por decocção (RODAL et al., 2008; LIMA et AL., 2011).

M. ophthalmocentra conhecida popularmente como Jurema vermelha, vem sendo bastante pesquisada por ter um elevado valor de importância, de acordo com os baixos valores de IVI constatados para a maioria das espécies, refletem a predominância de indivíduos de pequeno porte, ou ainda a presença de poucos indivíduos para a maioria das espécies (ANDRADE et al. 2005).

2.4.4.8 *Parapiptadenia rígida* Benth.

Conhecida popularmente como Angico vermelho e o seu nome científico *P. rígida*, possuem uma grande riqueza da parte fármacos, em folhas e casca é utilizadas para devidos fins: anti microbiano, dor de cabeça, febre e tratamento de pele. Sua fruta é conhecida no Brasil como abacate, pois as cascas, frutos e folhas são usados na medicina popular da América do Sul para o tratamento de várias doenças, como: distúrbios estomacais, diarreia (DING et al., 2007; ANDREZZA et al., 2008).

Araújo e colaboradores (2014) relataram a *P. rígida* apresentaram atividades contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo suscetível gram-positiva foi *Staphylococcus epidermidis* e a Gram-negativas foi a *Shigella flexneri*. Além disso, estudos farmacológicos realizados com a solução extrativa de suas folhas confirmam propriedades terapêuticas, como anti-inflamatória e analgésica (CHEN et al., 2009). De acordo com Schmidt e colaboradores (2010) isolaram compostos de *P. rígida*, esses compostos exibiram efeitos promissores de cicatrização de feridas num ensaio de raspagem.

2.4.4.9 Mimosa tenuiflora Willd

M. tenuiflora conhecida popularmente por Jurema preta é nativa do Nordeste Brasileiro, onde foi introduzida com sucesso em regiões úmidas dos Estados da Paraíba (Brejo Paraibano), Rio de Janeiro (Baixada Fluminense e Planaltos Fluminenses), São Paulo (Vale do Paraíba do Sul e Planaltos Paulistas) e Minas Gerais (Norte e Sul de Minas Gerais), sendo conhecida nessas regiões como Jurema preta, suas folhas verdes, ou secas, forrageira e servem de fonte de alimento para ruminantes, possuem alto valor nutricional, contendo aproximadamente 17% de proteína (Lorenzi, 2000). Suas cascas apresentam alto teor de taninos e flavonoides, com propriedades anti-hepatotóxica, anti-inflamatória, antiaterogênica, antialérgica e antimicrobiana (SANTOS et al., 2010; CRUZ, 2016).

Magalhães e colaboradores (2018) relataram em teste de atividade antioxidante por TLC identificou compostos fenólicos em todos os extratos da *M. tenuiflora*. Estudo fitoquímico com extratos produzidos a partir da casca da jurema, que revelou a presença de taninos e outros compostos fenólicos, além da presença de saponinas e um indicativo de alcalóides. A *M. tenuiflora* demonstrou atividade antimicrobiana frente à *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans* e *C. neoformans* (BEZERRA et al., 2009; SOUZA et al., 2018).

De acordo com Valencia-Gomes e colaboradores (2016) a *M. tenuiflora* mostraram propriedades potencialmente cicatrizantes, a aplicação direta da casca seca em pó à lesão, para tratar queimaduras, feridas e contra a um amplo grupo de microorganismos. O extrato padronizado de tanino obtido da casca de *M. tenuiflora* também apresentou excelentes propriedades terapêuticas para o tratamento de úlceras venosas da perna e fortes propriedades antimicrobianas (CRUZ et al., 2016)

2.5 SINERGISMO E MÉTODOS DE AVALIAÇÃO

Alterar o efeito de um medicamento a partir da administração anterior, simultânea, ou posterior de outro é denominado de interação medicamentosa. A resposta farmacológica a partir da interação pode ser potencializada (sinergismo), diminuída (antagônica) ou não proporcionar nenhum efeito terapêutico desejado (indiferente) (LEWIS et al., 2002; ULRICH et al., 2009).

Em (2002), Lewis e colaboradores destacavam o crescimento no interesse pelo uso da terapia baseada na combinação de antifúngicos, que esta relacionada diretamente ao aumento dos casos de resistências de fungos aos medicamentos atualmente comercializados.

Embora o *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), atualmente nomeado *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) não padroniza um método *in vitro* para testes de combinações de antifúngicos, existem vários métodos descritos na literatura, entre esses, destacam-se os métodos de disco difusão, *checkerboard*, *time-kill* e método epsilométrico (LEWIS et al., 2002; ODDS et al., 2003; PANKEY et al., 2009; ULRICH et al., 2010).

2.5.1 Método de *Checkerboard*

Checkerboard é uma das metodologias mais aplicada para a avaliação *in vitro* da combinação de diferentes drogas antimicrobianas, feito diretamente ligado a relativa facilidade de realização (LEWIS et al., 2002; ODDS et al., 2003; ULRICH-MERZENICH et al., 2010).

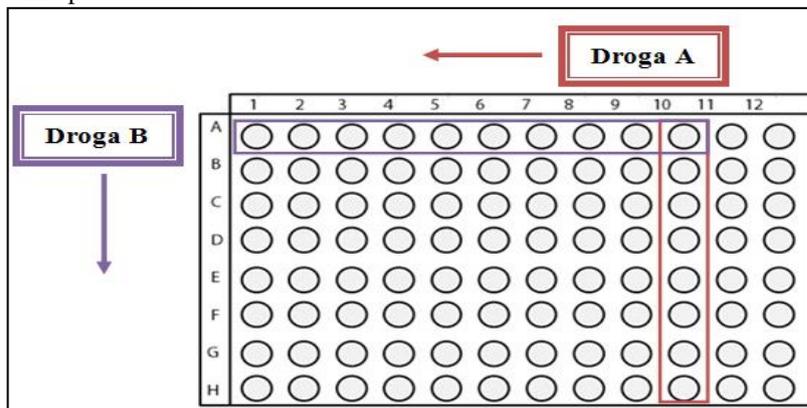
A interpretação do sinergismo a partir da combinação de diferentes fármacos é baseada no Índice de concentração inibitória fracionária, definido pela soma dos índices de Concentração Inibitória Fracionada para cada droga, que corresponde à relação entre o CIM de cada droga utilizada em combinação e o CIM da mesma droga testada isoladamente (LEWIS et al., 2002; ODDS et al., 2003; WAGNER, ULRICH-MERZENICH, 2009).

Lewis et al. (2002) apresentaram quatro parâmetros para avaliação da interação medicamentosa. O sinergismo é determinado quando o ICIF for $\leq 0,5$. Medicamentos são considerados aditivos quando o ICIF for $> 0,5$, mas < 1 . Indiferente é definida quando o ICIF for ≥ 1 mas < 4 , e o antagonismo é determinado quando o ICIF for ≥ 4 .

Ulrich-Merzenich (2009) relataram apenas três combinações são estabelecidas. Sinergismo é determinado quando o ICIF for $\leq 0,5$. Moléculas sem interação medicamentosa é definida quando o ICIF for $> 0,5$ e $< 4,0$. Antagonismo quando o ICIF $> 4,0$.

As drogas são distribuídas em sentidos diferentes a partir das concentrações determinadas anteriormente de acordo com as concentrações inibitórias mínimas de cada droga sozinha. Em sentido vertical e horizontal de uma placa de microtitulação contendo meio líquido, como apresentado na Figura 5 (LEWIS et al., 2002; ODDS et al., 2003; ORHAN et al., 2005; WHITE et al., 1996; YAN et al., 2014).

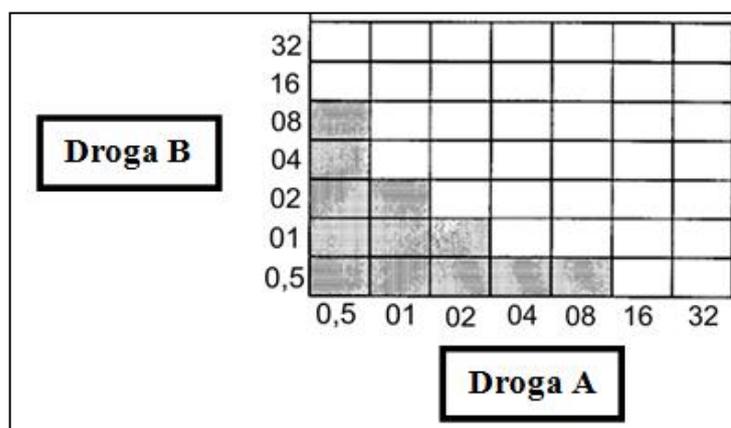
Figura 5– Esquema da distribuição de duas drogas diferentes para avaliação do sinergismo. Droga A colocada na vertical e diluída em sentido horizontal da direita para esquerda. Droga B colocada na horizontal e diluída em sentido vertical de cima para baixo.



Fonte: Araujo, 2016

A forma das diluições em série, as menores concentrações das drogas são encontradas nos eixos de encontro das linhas ordenadas e abcissas da placa de microtitulação, conforme Figura 6 (ORHANet al., 2005).

Figura 6 – Método de *Checkerboard* resultante da combinação de duas drogas. Concentrações compreendidas no encontro dos eixos de da ordenada e abcissas ($\mu\text{L.mL}^{-1}$).



Fonte:

De acordo com Lewis et al., (2002) o teste de *Checkerboard* apesar de ser apenas um indicador da inibição em apresentar uma medida relativa da potência da combinação entre diferentes fármacos, é um dos métodos mais utilizados, por interpretação e por sua facilidade de realização.

2.5.2 Método de *Time-Kill*

Método de avaliação *in vitro* de interação medicamentosa de agentes antimicrobianos, pois metodologia realizada por macrodiluição de acordo com as normas do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (PETERSEN et al., 2006; WHITE et al., 1996;).

Investigar a concentração do fármaco e a morte dos micro-organismos em diferentes intervalos de tempo do ensaio. O número médio de colônias (UFC/mL) obtidas com a droga combinada e sozinha é comparado com o controle sem a droga. Os resultados são expressos em log de UFC/mL (PANKY et al., 2009; WHITE et al., 1996).

Sinergismo é determinado quando acontece a redução ≥ 100 vezes da quantidade de colônias em contato com os fármacos associados em comparação ao inóculo no fármaco isolado, após incubação de 24 horas. Tratamento combinado categorizada como indiferente quando a mudança < 10 vezes na contagem das colônias em contato com os fármacos combinados em comparação ao inóculo no fármaco isolado, após incubação de 24 horas. Antagonismo forma quando o aumento ≥ 100 vezes da quantidade de colônia em contato com os fármacos combinados em comparação ao inóculo no fármaco isolado, após 24 horas (WAYNE et al., 1999; WHITE et al., 1996).

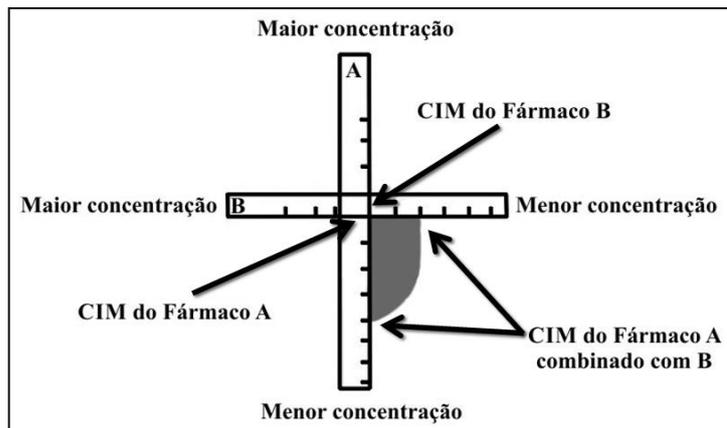
Apesar de demonstrar bons resultados com utilidade para a iniciação terapêutica, o *time-kill* apresenta a desvantagem de ser um método intenso (laboriosos) (PANKEY et al., 2009; WHITE et al., 1996).

2.5.3 Método Epsilométrico (e-test)

Com relação às metodologias de *checkerboard* e *time-kill*, o método que utiliza uma fita graduada nomeada E-test é o mais simples e requer uma quantidade menor de materiais, podendo também permitir a avaliação do sinergismo entre duas moléculas diferentes *in vitro* (BONAPACE et al., 2000; WHITE et al., 1996).

As tiras de E-test são colocadas em ágar numa formação cruzada, com um ângulo de 90° na intersecção entre as escalas em suas respectivas CIM para o organismo e incubadas durante 18 horas a 35°C, como apresentado na Figura 7 (BONAPACE et al., 2000; WHITE et al., 1996).

Figura 7 – Método E-test para a determinação da interação medicamentosa de dois fármacos diferentes.



Fonte: WHITE et al., (1996)

Os parâmetros que caracterizam sinergismo ou antagonismo entre diferentes moléculas são determinados em cálculo através do somatório dos índices de concentração inibidora fracional (ICIF) (BONAPACE et al., 2000; LEWIS et al., 2002).

3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

3.1 CULTURAS FUNGICAS

Nos ensaios, foram utilizadas trinta espécies de *candida*, sendo oito *C. albicans*, cinco *C. tropicalis*, oito *C. krusei*, oito *C. parapsilosis*, oito *C. glabrata* e oito *C. guilliermondii* estocados da Coleção de Cultura URM da Universidade Federal de Pernambuco.

3.3.1 Identificação dos isolados por Espectrometria de Massas (MALDI-TOF MS)

Os isolados foram cultivados em Sabouraud dextrose ágar e incubados a 37°C durante 24 horas. Após o crescimento, três a cinco colônias de cada isolado de levedura foram transferida para um tubo Eppendorf contendo 300 µL de água destilada, e em seguida a suspensão foi homogeneizada em vórtex por 1 minuto. Na sequência, 900 µL de álcool absoluto foi adicionado em cada Eppendorf e homogeneizado. As amostras foram centrifugadas durante 2 min a 13000g e o sobrenadante foi removido.

Após a formação do *pellet*, 50 µL de ácido fórmico a 70% e um volume equivalente de acetonitrila foi adicionado misturados em vórtex e posteriormente centrifugado por 2 min a 13000 g.

Do sobrenadante de cada isolado, 1µL foi adicionado em duplicata no interior do *spot* da placa em aço do MALDI, e mantidos a temperatura de 27°C. Posteriormente, foi recoberto com 1µL da matriz orgânica contendo uma solução saturada de α -ciano-4-ácido hidroxicinâmico em 50% de acetonitrila e 2,5% de ácido trifluoroacético.

As placas foram secas em temperatura de 27°C e introduzidas no espectrômetro de massas (MALDI-TOF Autoflex III Bruker Laser nd:yag smartbeam, Bruker Daltonics Inc., USA/Germany) para em seguida ser obtido os espectros protéicos.

Os espectros para determinação do perfil protéico dos isolados foram obtidos através do laser Nd:YAG (*neodymium-doped yttrium aluminium garnet*; Nd:Y₃Al₅O₁₂) de 1064nm, onde a intensidade do laser foi ajustada acima do limiar para a produção de íons. Para calibração foi usado um kit protéico (*protein calibration standart I*, Bruker Daltonics, Bilerica, MA, USA) com conhecidos valores de massa das proteínas, usado para calibração.

A variação de massa entre 2.000 a 20.000 Da foi registrado usando modo linear com pulso de 104 ns em uma voltagem de +20 kV. Espectros finais foram gerados através da soma de 20 tiros de laser acumulados e 50 perfis produzidos por amostra, levando a um total de 10.800 disparos de laser somados por espectro. A lista de picos será exportada ao *software*

MALDI Biotyper™ 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) e as identificações finais baseadas em cada pico espectro (MC TAGGART et al., 2011).

McTaggart et al. (2011) Identificaram por Espectrometria de Massas MALDI-TOF MS um total de 160 isolados de levedura, incluindo 137 Cepas de *Cryptococcus*, 23 leveduras de outras espécies como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *S. cerevisiae* 25 estirpes de referência.

3.2 MATERIAIS VEGETAIS

Os materiais vegetais de espécies comuns no Nordeste brasileiro foram coletados em três estados (Pernambuco – PE; Paraíba – PB ou Rio Grande do Norte – RN) em 2009 e 2010 como apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Plantas medicinais do Nordeste brasileiro selecionadas para o estudo.

Nome botânico	Nome Popular	Parte usada	Estado de Coleta	Instituto de identificação Exsicata
<i>Eugenia uniflora</i>	Pitangueira	F	RN	UFRN11763
<i>Libidia férrea</i>	Pau ferro	C	PE	IPA-PE 86678
<i>Psidium guajava</i>	Goiabeira	C	RN	UFRN 8214
<i>Persea americana</i>	Abacateiro	CC	PE	IPA-PE 52805
<i>Anadenanthera colubrina</i>	Angico	F	RN	UFRN 38384
<i>Schinus terebinthifolius</i>	Aroeira	CC	PB	IPA 8758
<i>Mimosa ophthalmocentra</i>	Jurema	CC	PB	IPA-PE 83114
<i>Parapiptadenia rígida</i>	Angico	CC	PB	IPA-PE 83115
<i>Mimosa tenuiflora</i>	Jurema preta	CC	PE	IPA 83113

Parte usada: F: folhas; C: cascas; CC: Cascas e Caule.

3.2.1 Preparação dos extratos brutos (EB)

O material vegetal seco e moído foi levado a um liquidificador industrial (Metvisa®, Brazil) por 20 minutos, sendo 4 ciclos extrativos 30 segundos e intervalos de 5 minutos entre

cada ciclo. Para cada 50 g de material vegetal, foram adicionados 500 mL de água ou a mistura acetona/água (1:1 ou 7:3; v/v) como líquidos extratores, na proporção de planta: solvente 10% (p/v). Após obtenção, os extratos foram filtrados e concentrados em evaporador rotatório (IKA[®], Germany) sob pressão reduzida (40 °C). Por fim, os extratos foram congelados em freezer a 80 °C durante 3 dias e liofilizados (Liobras[®], Brazil), obtendo-se assim os extratos brutos (EB) (MORAES et al., 2017).

3.2.2 Obtenção da fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa (FAQ)

O extrato bruto total foi disperso em água destilada e particionado 10 a 12 vezes com acetato de etila (MORAES et al., 2017). As fases acetato de etila foram reunidas, concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida até eliminação total do solvente orgânico, congeladas e liofilizadas, sendo obtidas as frações acetato de etila (FAE). A fase aquosa restante foi concentrada, congelada e liofilizada, obtendo-se a fração aquosa.

3.2.3 Caracterização dos extratos brutos

Os extratos brutos/frações foram caracterizados quanto ao teor de polifenóis totais por espectrofotometria no ultravioleta-visível e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), de acordo com metodologias preconizadas pela Farmacopeia Brasileira 5ª Edição com algumas adaptações (BRASIL, 2010 e BEZERRA et al., 2017).

3.2.4 Atividade antifúngica dos extratos in vitro

A determinação da CIM seguiu o protocolo do documento M27-A3 (CLSI, 2008). O meio de cultura utilizado para a realização dos testes foram RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) tamponado com ácido morfolino-propano-sulfônico (MOPS) e ajustado em pH $7 \pm 0,1$. A FAE e a FAQ dos metabólitos de interesse foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) e água destilada, respectivamente. Em seguida foram avaliados em concentrações variando de 4 a $2.048 \mu\text{g.mL}^{-1}$ frente aos isolados clínicos de *Candida*. Os antifúngicos comercialmente disponíveis avaliados foram a anfotericina B (*Bristol-Myers Squibb*) diluída em DMSO e fluconazol (Pfizer) preparados em água destilada em concentrações variando de 0,015 a 16 g.mL^{-1} e 0,125 a 64 g.mL^{-1} para anfotericina B e fluconazol respectivamente.

As leveduras foram mantidas em meio Sabouraud Dextrose Ágar suplementado de extrato de levedura e incubadas a 35°C por 24 horas. As suspensões dos isolados foram

preparadas em solução salina (8,5 g/L) e a densidade foi ajustada de acordo com a escala 0,5 de MacFarland em 90% da transmitância utilizando um espectrofotômetro a 530 nm.

Em seguida foram realizadas diluições em série do inóculo, primeiro de 1:100 ($2,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹) em salina e depois em meio líquido RPMI 1640 de 1:20 ($1,0 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹).

Os testes de sensibilidade foram realizados em placas de microtitulação planas com 96 poços (TPP; Trasadingen, Suíça). Os inóculos foram adicionados aos poços com os antifúngicos, e as placas incubadas a 35°C por 24 horas. As CIM's foram determinadas em relação aos poços controles em 100% e 50% para anfotericina B e fluconazol (LEWIS et al., 2002; ODDS et al., 2003).

3.2.5 Sinergismo

Seguindo o protocolo do documento M27-A3 (CLSI, 2008), porém, modificando a fase da preparação das placas, para dessa forma, combinar o extrato bruto mais os antifúngicos convencionais (LEWIS et al., 2002; ODDS et al., 2003; ULRICH – MERZENICH et al., 2009).

Os antifúngicos comercialmente disponíveis avaliados foram a anfotericina B colocado na placa com a concentração variando de 16 µg.mL⁻¹ a 0,25 µg.mL⁻¹ e Fluconazol em concentrações variando de 32 µg.mL⁻¹ a 0,5 µg.mL⁻¹. A fração de *Schinus terebinthifolius* foi preparada em uma concentração entre 0,5 µg.mL⁻¹ a 128µg.mL⁻¹.

O parâmetro para avaliação da interação medicamentosa seguiu o modelo de Lewis et al. (2002). O sinergismo foi determinado quando o ICIF for $\leq 0,5$. Foram considerados Aditivos quando o ICIF foi $> 0,5$ e < 1 , indiferentes quando o ICIF for ≥ 1 e < 4 e o Antagonismo foi determinado quando o ICIF for ≥ 4 .

3.3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA IN VIVO

A atividade antifúngica *in vivo* do metabólito de interesse mais efetivo, de acordo com os testes *in vitro*, foi analisada através de um modelo de infecção experimental de candidíase em ratos *Wistar* convencionais com oito a 12 semanas de idade, pesando 250 g, obtidos no biotério do Departamento de Farmacologia e Fisiologia do CCS/UFPE.

Modelo murino neutropênico foram realizados para se atingir a candidíase disseminada de acordo com Andes et al. (2008). A neutropenia nos animais (contagem de células polimorfos nucleares $< 100/\text{mm}^3$) foi induzida através de aplicação subcutânea de ciclofosfamida (Mead Johnson Pharmaceuticals, Evansville, IN) quatro dias antes da infecção fúngica (150 mg/Kg de peso corpóreo), um dia antes da infecção (75 mg/Kg) e dois dias após a infecção (75 mg/Kg).

A contagem total de leucócitos no sangue dos animais foi realizada para confirmar a imunossupressão (ANDES et al., 2008).

O inóculo fúngico foi realizado em *C. glabrata*, preparado em 5 mL de solução salina esterilizada a 0,9% com 10^7 células/mL ajustada em espectrofotômetro. A candidíase disseminada foi alcançada pela injeção de 0,1 mL do inoculo via veia caudal 24 horas antes do início da terapia com o extrato, em seguida foram feitos exames para verificar se o mesmo estava infectado.

O metabólito extrato diluído em *phosphate buffered saline* (PBS) foi administrado por via oral em uma concentração de 500 mg.Kg^{-1} , por 2 dias consecutivos após o desafio a partir da infecção por um dos isolados de espécie de *C. glabrata*. Os grupos foram divididos em: (G1) = apenas imunossuprimido; G2 = imunossuprimido infectado; G3 = imunossuprimido infectado + tratado com fluconazol; G4 = imunossuprimido infectado + tratado com anfotericina B e G5 = imunossuprimido infectado + tratado com extrato vegetal.

A eficácia do ácido gálico e o extrato bruto de *E. uniflora*, foram avaliadas através do prolongamento da taxa de sobrevivência dos animais e pela ausência de células de leveduras nas amostras de sangue analisadas. Para estudo de sobrevivência, os animais foram observados diariamente por 28 dias a partir do início da infecção. Amostras de 2 mL de sangue caudal foram coletados e analisadas em um, três, sete e quinze dias após desafio em todos os animais sobreviventes. Após o término os animais sobreviventes foram eutanasiados em câmara de CO_2 .

Os exames micológicos foram realizados com a preparação de lâminas clarificadas com hidróxido de potássio, e cultura em ágar Sabouraud. Após o retrocultivo foi realizado a confirmação taxonômica por espectrometria de massa MALDI-TOF MS.

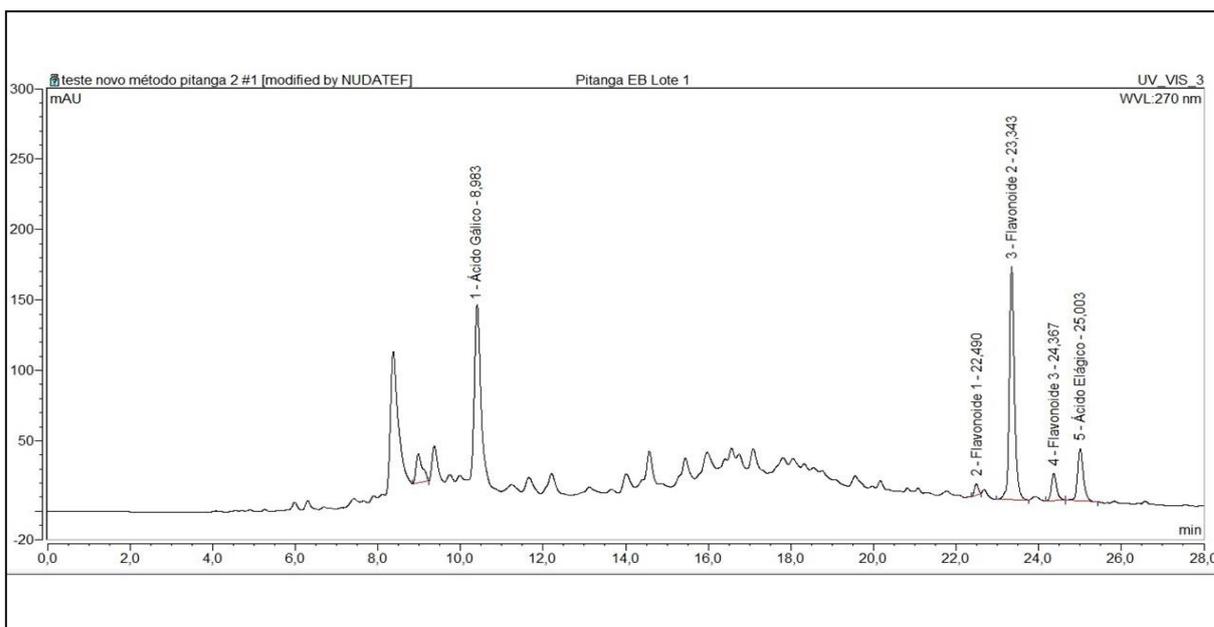
Um total de vinte e quatro ratos *Wistar* com média de peso de 200-250g mantidos em jejum de 12 horas antes dos ensaios. Os animais receberam 5 g.Kg^{-1} do extrato bruto de *E. uniflora* Act/Aq (1:1) por via oral, e foram acompanhados por 30 dias (ALVES et al., 2014).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PERFIL QUÍMICO DE *E. UNIFLORA* L.

De acordo com o perfil cromatográfico do composto Acetona: Água (1:1) de *E. uniflora* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD), foi observado a presença de ácido gálico e flavonóide com teores de 0,22g% 0,48g% respectivamente, Os tempos de retenção (TR) para Àcido gálico e Flavonóide nestas amostras foram 10,2 min Pico 1 e 23,5 min Pico 3(Figura 8).

Figura 8 – Perfil cromatográfico de *Eugenia. uniflora* por CLAE-DAD. Teores calculados por CLAE: Pico 1: ácido gálico: 0,22g%. Pico 3: flavonóide: 0,48g% .



Fonte: 1 Bomfim et al., 2018

Alves e colaboradores (2014) através de análise química do extrato etanólico de *E. uniflora* revelaram a presença de fenóis, terpenos, e antraquinonas. Para extratos preparados em hexano pode ser observada a presença de flavonas, xantonas, flavonóides, esteróides livres, antraquinonas e terpenos.

Bagetti et al. (2011) em estudos fitoquímicos da fase acetato de etilo proveniente do extrato etanólico de folhas de *E. uniflora* foram isolados e identificados quatro compostos bioativos: ácido gálico, miricetina, quercetina e galato de metila, a caracterização físico-química de *E. uniflora* apresenta grande quantidade de compostos fenólicos, os quais estão diretamente ligados a sua capacidade antioxidante e os tipos de coloração que o fruto apresenta.

Ghosh et al. (2015) isolaram a partir da folha de *E. uniflora* seis compostos: ácido gálico, galato de etila, galato de metila, catequina e flavonóides. Assim como Chen e colaboradores (2016), Santos et al. (2010) identificaram das folhas de *E. uniflora* presença de ácido gálico.

Segundo Reis et al. (2016) os compostos fenólicos são substâncias relevantes que sevem para mecanismos de defesa da planta contra fungos, bactérias, vírus, parasitas, insetos, moluscos e animais superiores, podendo servir de antifúngico e antibacteriano.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE *CANDIDA* POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MALDI-TOF MS)

Todos os isolados foram identificados por Espectrometria de Massas MALDI-TOF ao *taxo* de espécie. Dos isolados analisados, trinta espécies de *Candida*., sendo cinco amostra de cada espécie incluindo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. guilliermondii*.

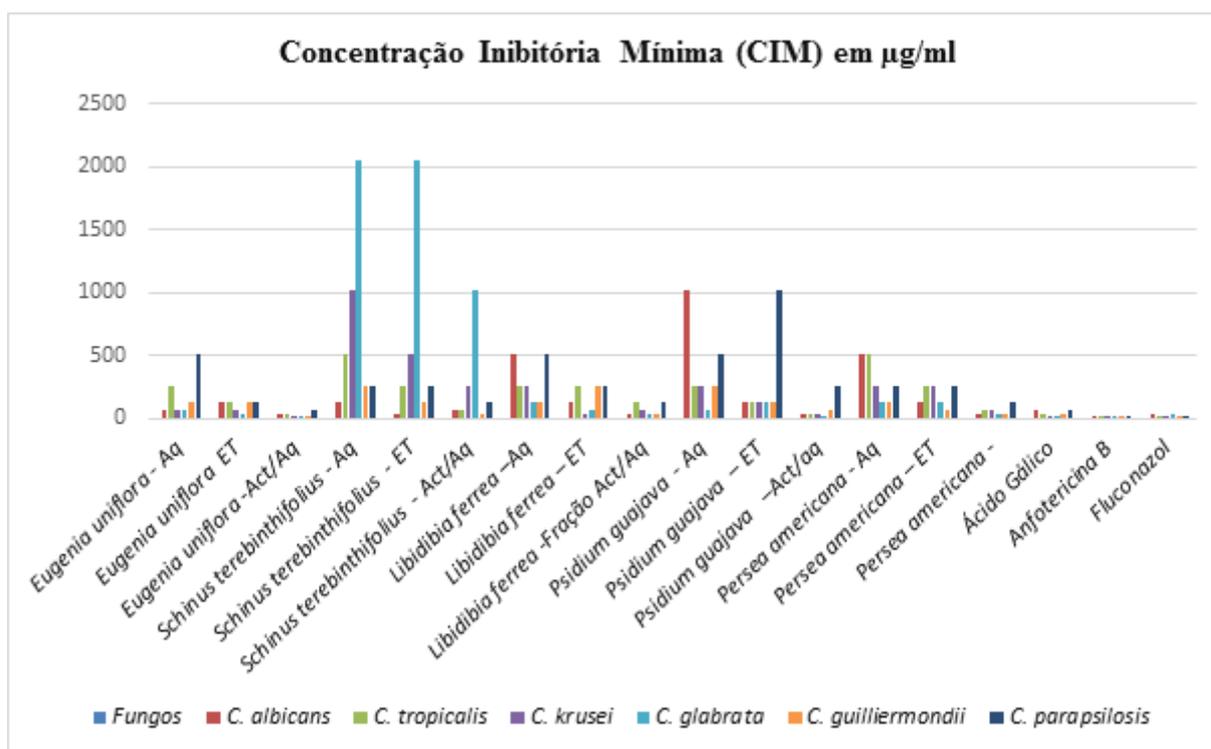
Através da Espectrometria de Massas MALDI-TOF, McTaggart e colaboradores (2011) identificaram um total de 160 isolados de levedura, incluindo 137 cepas de *Cryptococcus* 23 leveduras de outras espécies como *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Segundo Angeletti (2016) a espectrometria de massas permite que comparações de isolados com os espectros de referencia com cepas catalogadas facilitam a identificação do fungo com maior rapidez.

4.3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA IN VITRO DAS SUBSTANCIAS ISOLADAS DE PLANTAS MEDICINAIS

De acordo com os dados obtidos dos extratos brutos dos diferentes vegetais, frente às seis espécies de *Candidas* a fração act/aq de *E. uniflora* apresentou a melhor CIM, variando de $4\mu\text{g.ml}^{-1}$ a $32\mu\text{g.ml}^{-1}$. O extrato aquoso apresentou CIM $64\mu\text{g/ml}^{-1}$ a $512\mu\text{g.ml}^{-1}$ e o composto etanólico $32\mu\text{g.ml}^{-1}$ a $128\mu\text{g.ml}^{-1}$ como mostra a (figura 9).

O extrato aquoso de *S. terebinthifolius* teve a CIM de $128\mu\text{g.ml}^{-1}$ a $1024\mu\text{g.ml}^{-1}$, já o etanólico foi compreendido $32\mu\text{g.ml}^{-1}$ a $2048\mu\text{g.ml}^{-1}$ e o extrato fração act/aq em $32\mu\text{g.ml}^{-1}$ a $1024\mu\text{g.ml}^{-1}$ p. guajava teve a CIM para extrato aquoso em $32\mu\text{g.ml}^{-1}$ a $1024\mu\text{g.ml}^{-1}$, o etanólico apresentou valores de $128\mu\text{g.ml}^{-1}$ a $1024\mu\text{g.ml}^{-1}$, e o acetato aquoso $32\mu\text{g.ml}^{-1}$ a $256\mu\text{g.ml}^{-1}$.

Figura 9 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) em $\mu\text{g/ml}$.

Fonte:

O extrato fração act/aq obtido do vegetal *P. Americana* obtiveram a concentração inibitória mínima $128 \mu\text{g.ml}^{-1}$ - $512 \mu\text{g.ml}^{-1}$ e $64 \mu\text{g.ml}^{-1}$ - $246 \mu\text{g.ml}^{-1}$, e o composto acetato aquoso foi determinado a CIM entre $32 \mu\text{g.ml}^{-1}$ a $128 \mu\text{g.ml}^{-1}$, como demonstrado na tabela 03

Tabela 3 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/ml de Extratos Brutos, Ácido gálico, Anfotericina B e Fluconazol, frente a Isolados Fúngicos

Fungos	<i>Eugenia uniflora</i> - Aq*	<i>Eugenia uniflora</i> - ET ⁺	<i>Eugenia uniflora</i> - Act/Aq [#]	<i>Schinus terebinthifolius</i> - Aq*	<i>Schinus terebinthifolius</i> - ET ⁺	<i>Schinus terebinthifolius</i> - Act/Aq [#]	<i>Libidibia ferrea</i> - Aq*	<i>Libidibia ferrea</i> - ET ⁺	<i>Libidibia ferrea</i> - Fração Act/Aq [#]	<i>Psidium guajava</i> - Aq*	<i>Psidium guajava</i> - ET ⁺	<i>Psidium guajava</i> - Act/aq [#]	<i>Persea americana</i> - Aq*	<i>Persea americana</i> - ET ⁺	<i>Persea americana</i> - Act/Aq [#]	Ácido Gálico	AnfB [‡]	FLU [¶]
<i>C. albicans</i>	64	128	32	128	32	64	512	128	32	1024	128	32	512	128	32	64	0,5	32
<i>C. tropicalis</i>	256	128	32	512	256	64	256	256	128	256	128	32	512	256	64	32	0,25	16
<i>C. krusei</i>	64	64	8	1024	512	256	256	32	64	256	128	32	256	256	64	16	0,5	16
<i>C. glabrata</i>	64	32	4	2048	2048	1024	128	64	32	64	128	16	128	128	32	16	0,5	32
<i>C. guilliermondii</i>	128	128	16	256	128	32	128	256	32	256	128	64	128	64	32	32	0,25	16
<i>C. parapsilosis</i>	512	128	64	256	256	128	512	256	128	512	1024	256	256	256	128	64	0,5	16

Aq* = aquoso, Act/Aq[#] = acetato aquoso, ET⁺ = etanólico, AnfB[‡] = Anfotericina B, FLU[¶] = Fluconazol.

4.4 AVALIAÇÃO DO SINERGISMO DE *E. UNIFLORA* E ÁCIDO GÁLICO EM COMBINAÇÃO COM ANFOTERICINA B E FLUCONAZOL

Os antifúngicos comercialmente disponíveis avaliados foram a anfotericina B em concentração variando de 16 g.mL⁻¹ a 0,25 g.mL⁻¹ e fluconazol em concentrações variando de 32 g.mL⁻¹ a 0,5 g.mL⁻¹. O extrato bruto de *E. uniflora* - Act/Aq e ácido gálico foram preparados em uma concentração entre 128g.mL⁻¹ a 0,5 g.mL⁻¹.

A interpretação do sinergismo da combinação do extrato com os fármacos foi baseada em um cálculo através do somatório dos índices de Concentração inibidora fracional (ICIF).

Quando testados frente à combinação com anfotericina B todos os isolados apresentaram ICIF>4, caracterizando antagonismo. Entretanto a combinação de *E. uniflora* Act/Aq com fluconazol apresentou aditiva, com o ICIF > 0,5 e < 1. Nenhuma combinação apresentou sinergismo para os isolados analisados, tabela 04.

Tabela 4 - Avaliação do Sinergismo de Eugenia uniflora L.e Ácido Gálico combinado com Anfotericina B (AMB) e Fluconazol (FLU). Frente a isolados de fungico de Candida spp

Isolados Fúngicos	(ICIF*) FLU ¹ + <i>E. uniflora</i> -Act/Aq [#]	Parâmetro FLU + <i>E. uniflora</i> -Act/Aq [#]	(ICIF*) AmB + <i>E. uniflora</i> -Act/Aq [#]	Paramentros AmBE. <i>uniflora</i> -Act/Aq [#]	(ICIF) FLU + Ácido Gálico	Paramentros FLU + Ácido Gálico	(ICIF) AmB+ Ácido Gálico	Paramentros AmB + Ácido Gálico
<i>C. albicans</i>	0.625	Aditivas	>4	Antagônicas	>4	Antagônicas	>4	Antagônicas
<i>C. tropicalis</i>	0.625	Aditivas	>4	Antagônicas	>4	Antagônicas	>4	Antagônicas
<i>C. krusei</i>	0.625	Aditivas	>4	Antagônicas	>4	Antagônicas	>4	Antagônicas
<i>C. glabrata</i>	0.625	Aditivas	>4	Antagônicas	>4	Antagônicas	>4	Antagônicas
<i>C. guilliermondii</i>	0.625	Aditivas	>4	Antagônicas	>4	Antagônicas	>4	Antagônicas
<i>C. parapsilosis</i>	0.625	Aditivas	>4	Antagônicas	>4	Antagônicas	>4	Antagônicas

Fonte:

4.5 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VIVO* DO EXTRATO BRUTO DE *E. UNIFLORA*

Após a imunossupressão de ataque e as seguidas imunossupressões de manutenção todas as cobaias se apresentaram neutropênicos, de acordo com a contagem de leucócitos, variando de 0,11 a $0,52 \times 10^3/\mu\text{L}$, e diminuição na contagem de plaquetas ($134-205 \times 10^3/\mu\text{L}$). Os parâmetros bioquímicos apresentaram valores normais para aspartato aminotransferase (AST) (68,1-86,8 U/L), alanina aminotransferase (ALT) (37,97-46,35 U/L) e uréia (43,11-45,52 mg/dL). Esses dados podem ser observados na tabela 05.

Tabela 5 - Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos de ratos *Wistar* fêmeas antes da infecção. Valores expressos em média \pm Desvio padrão e (n) – número de animais.

Parâmetros (Unid.)	*G1 - Média (n) D.P. (n)	**G2 - Média D.P. (n)	¶G3 - Média D.P. (n)	¶¶G4 - Média D.P. (n)	‡G5 - Média D.P. (n)	Valores de referência
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	5,07 \pm 0,75 (8)	10,61 \pm 0,68 (8)	9,71 \pm 0,66 (8)	8,76 \pm 0,34 (8)	9,31 \pm 0,09 (8)	4,96 \pm 1,55
Hemácias ($10^6/\mu\text{L}$)	6,75 \pm 0,74 (8)	7,59 \pm 0,58 (8)	6,68 \pm 0,56 (8)	6,05 \pm 0,49 (8)	6,02 \pm 0,32 (8)	5,21 – 8,83
Hemoglobina (g/d)	12,325 \pm 1,25 (8)	10,4 \pm 0,42 (8)	12,11 \pm 1,10 (8)	13,55 \pm 1,20 (8)	13,2 \pm 0,26 (8)	14,33 \pm 1,19
Hematócrito (%)	35,37 \pm 3,79 (8)	35,55 \pm 1,37 (8)	36,03 \pm 3,24 (8)	36,1 \pm 8,50 (8)	36,93 \pm 1,76 (8)	40,52 \pm 3,77
VCM (f)	52,42 \pm 0,72 (8)	53,25 \pm 1,90 (8)	51,81 \pm 2,24 (8)	51,95 \pm 15,57 (8)	51,81 \pm 1,40 (8)	50,97 \pm 2,00
CHM (pg)	18,275 \pm 0,17 (8)	17,95 \pm 0,86 (8)	18,03 \pm 0,46 (8)	17,86 \pm 0,45 (8)	18,2 \pm 0,08 (8)	18,23 \pm 1,75
CHCM (g/dL)	34,85 \pm 0,37 (8)	35,675 \pm 0,72 (8)	35,21 \pm 0,61 (8)	35,03 \pm 0,52 (8)	35,05 \pm 0,85 (8)	35,76 \pm 3,87
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	157 \pm 62,89 (8)	205 \pm 90,5 (8)	171,5 \pm 16,54 (8)	134 \pm 81,27 (8)	192,833 \pm 24,75 (8)	971 \pm 140
Neutrófilos ($10^3/\mu\text{L}$)	1,08 \pm 0,17 (8)	4,24 \pm 0,24 (8)	3,15 \pm 0,21 (8)	2,26 \pm 0,21 (8)	2,08 \pm 0,201 (8)	1,86 \pm 0,99
Linfócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	6,50 \pm 0,11 (8)	9,49 \pm 0,41 (8)	7,52 \pm 0,19 (8)	6,47 \pm 0,16 (8)	7,43 \pm 0,14 (8)	6,76 \pm 2,57
Monócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	0,29 \pm 0,520 (8)	2,035 \pm 0,036 (8)	1,213 \pm 0,420 (8)	1,171 \pm 0,486 (8)	0,196 \pm 0,403 (8)	0,067 \pm 0,061

Eosinófilos (10 ³ /μL)	0,020 ± 0,009 (8)	0,095 ± 0,017 (8)	0,058 ± 0,007 (8)	0,041 ± 0,006 (8)	0,048 ± 0,008 (8)	0,010 ± 0,023
Basófilos (10 ³ /μL)	0,05 ± 0,04 (8)	0,02 ± 0,02 (8)	0,02 ± 0,024 (8)	0,02 ± 0,03 (8)	0,02 ± 0,00 (8)	0,01 ± 0,03
AST/TGO (U/L)	86,8 ± 17,69 (8)	68,1 ± 12,82 (8)	79,61 ± 17,95 (8)	92,46 ± 18,21 (8)	69,2 ± 23,96 (8)	107,87 ± 53,96
ALT/TGP (U/L)	46,35 ± 9,5 (8)	37,97 ± 4,38 (8)	42,96 ± 3,20 (8)	43,56 ± 3,83 (8)	40,65 ± 3,07 (8)	45,47 ± 9,23
Uréia (mg/dL)	43,75 ± 5,39 (8)	45,52 ± 4,68 (8)	44,36 ± 3,85 (8)	46,53 ± 3,25 (8)	43,11 ± 20,02 (8)	39,17 ± 6,43
Creatinina (mg/dL)	0,52 ± 0,05 (8)	0,54 ± 0,05 (8)	0,65 ± 0,05 (8)	0,86 ± 0,05 (8)	0,53 ± 0,05 (8)	0,57 ± 0,19

Legenda: *G1 = apenas imunossuprimido; **G2 = imunossuprimido + infectado; [†]G3 = imunossuprimido + infectado + tratado com fluconazol; ^{††}G4 = imunossuprimido + infectado + tratado com anfotericina B e [‡]G5 = imunossuprimido + infectado + tratado com extrato de *E. Uniflora*.

As culturas realizadas com sangue das cobaias após 24 horas da infecção foram obtidas para *C. glabrata*, apresentando um crescimento a 37°C. Na microscopia foram visualizadas células de leveduras. A identificação do isolado foi confirmada por MALDI-TOF MS.

No segundo dia de tratamento, as culturas dos grupos tratados com anfotericina B, fluconazol e com o extrato bruto de *E. Uniflora* Act:Aq (1:1) foram negativas, não havendo crescimento fúngico, sendo evidenciado a eficácia na terapia da candidíase.

Na avaliação hematológica após o tratamento as cobaias ainda apresentaram reduzida quantidade de Linfócitos devido à imunossupressão. Os parâmetros bioquímicos AST, ALT e uréia permaneceram dentro dos valores de referência para todos os grupos tratados como apresentado na tabela 06.

Tabela 6 - Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos de ratos *Wistar* fêmeas após o tratamento da infecção. Valores expressos em média ±. Desvio padrão e (n) – número de animais

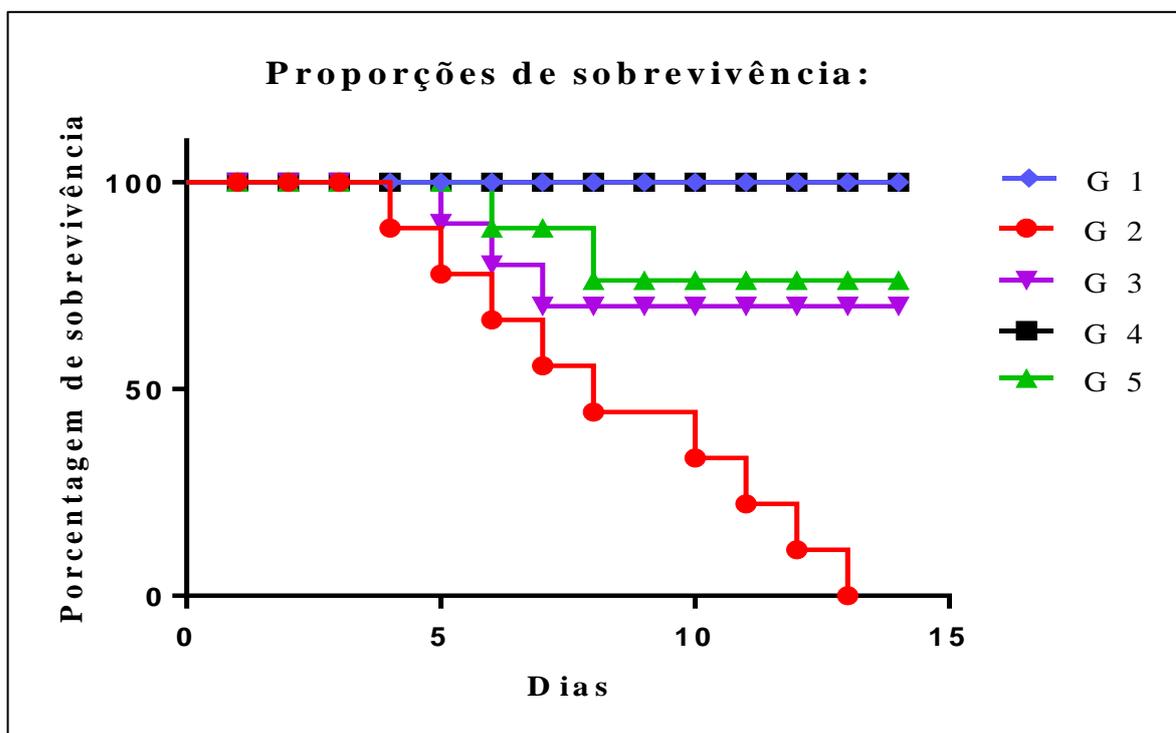
Parâmetros (Unid.)	*G1 - Media (n) D.P. (n)	**G2 - Media D.P. (n)	[†] G3 - Media D.P. (n)	^{††} G4 - Media D.P. (n)	[‡] G5 - Media D.P. (n)	Valores de referência
Leucócitos (10 ³ /μL)	1,31 ± 0,60 (8)	1,43 (1)	0,58 ± 0,34 (7)	0,61 ± 0,29 (8)	0,62 ± 0,40 (7)	4,96 ± 1,55
Hemácias (10 ⁶ /μL)	6,14 ± 0,69 (8)	6,92 (1)	7,98 ± 0,23 (7)	7,91 ± 0,54 (8)	7,16 ± 0,92 (7)	5,21 – 8,83
Hemoglobina (g/d)	13,02 ± 0,76 (8)	13,9 (1)	13 ± 0,62 (7)	12,56 ± 1,33 (8)	12,94 ± 0,68 (7)	14,33 ± 1,19
Hematócrito (%)	35,52 ± 2,19 (8)	40,9 (1)	35,54 ± 2,21 (7)	35,43 ± 8,09 (8)	36,98 ± 2,34 (7)	40,52 ± 3,77

VCM (f)	54,07 ± 1,32 (8)	59,1 (1)	51,5 ± 1,64 (7)	52,08 ± 2,91 (8)	51,94 ± 2,05 (7)	50,97 ± 2,00
CHM (pg)	18,37 ± 0,17 (8)	20,1 (1)	18,44 ± 0,16 (7)	18,11 ± 0,32 (8)	18,48 ± 0,31 (7)	18,23 ± 1,75
CHCM (g/dL)	35,07 ± 0,27 (8)	34,0 (1)	35,36 ± 0,97 (7)	35,03 ± 0,52 (8)	35,32 ± 0,69 (7)	35,76 ± 3,87
Plaquetas (10 ³ /μL)	285 ± 55,07 (8)	395 (1)	208,4 ± 51,27 (7)	261,66 ±61,84 (8)	310,6 ± 81,84 (7)	971 ± 140
Neutrófilos (10 ³ /μL)	0,42 ± 0,17 (8)	0,77 (1)	0,21 ± 0,23 (7)	0,268 ± 0,16 (8)	0,286 ± 0,18 (7)	1,86 ± 0,99
Linfócitos (10 ³ /μL)	0,27 ± 0,09 (8)	0,32 (1)	0,50 ± 0,07 (7)	0,478 ± 0,16 (8)	0,42 ± 0,08 (7)	6,76 ± 2,57
Monócitos (10 ³ /μL)	0,04 ± 0,02 (8)	0,29 (1)	0,20 ± 0,38 (7)	0,19 ± 0,37 (8)	0,27 ± 0,52 (7)	0,067 ± 0,061
Eosinófilos (10 ³ /μL)	0,01 ± 0,00 (8)	0,02 (1)	0,01 ± 0,00 (7)	0,03 ± 0,02 (8)	0,05 ± 0,04 (7)	0,010 ± 0,023
Basófilos (10 ³ /μL)	0,02 ± 0,01 (8)	0,01 (1)	0,02 ± 0,01 (7)	0,02 ± 0,01 (8)	0,10 ± 0,09 (7)	0,01 ± 0,03
AST/TGO (U/L)	88,57 ± 15,24 (8)	95,5 (1)	120,82±11,03 (7)	119,63 ±14,60 (8)	120,14±13,48 (7)	107,87 ± 53,96
ALT/TGP (U/L)	45,77 ± 7,51 (8)	34,2 (1)	46,54 ± 5,12 (7)	42,31 ± 2,34 (8)	39,42 ± 2,95 (7)	45,47 ± 9,23
Uréia (mg/dL)	43,92 ± 2,70 (8)	44,9 (1)	45,02 ± 2,42 (7)	44,53 ± 3,25 (8)	43,8 ± 21,30 (7)	49,17 ± 6,43
Creatinina (mg/dL)	0,2 ± 0,05 (8)	0,2 (1)	0,22 ± 0,04 (7)	0,28 ± 0,04 (8)	0,28 ± 0,04 (7)	0,57 ± 0,19

Legenda: *G1 = apenas imunossuprimido; **G2 = imunossuprimido + infectado; †G3 = imunossuprimido + infectado + tratado com fluconazol; ‡G4 = imunossuprimido + infectado + tratado com anfotericina B e †G5 = imunossuprimido + infectado + tratado com extrato de *E.uniflora*.

Análise da sobrevivência após a infecção foi calculada pelo método de Kaplan-Meier, sendo demonstrando que o grupo de ratos tratados para candidíase com *E.uniflora* (G5) apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparados com o grupo G3 e G2, apresentando valor de Log-rank $p < 0,05$. Porém, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) quando comparado com o grupo tratado com anfotericina B, como demonstrado no gráfico da (Figura 10).

Figura 10 – Sobrevivência acumulada a partir do primeiro dia da infecção entre os diferentes grupos de animais. G1 = apenas imunossuprimido; G2 = imunossuprimido+ infectado; G3 = imunossuprimido infectado + tratado com fluconazol; G4 = imunossuprimido infectado + tratado com anfotericina B e G5 = imunossuprimido infectado + tratado com extrato de *E.uniflora*)



Fonte:

Na avaliação *in vivo*, após a imunossupressão de ataque, todas as cobaias se apresentaram neutropênicos, de acordo com na contagem de leucócitos. Os parâmetros bioquímicos apresentaram valores normais.

Culturas realizadas com sangue das cobaias após 24 horas de infecção foram positivas para *C. glabrata*. A identificação do isolado foi confirmada por MALDI-TOF MS.

Na avaliação hematológica as cobaias ainda apresentaram reduzida quantidade de Linfócitos devido à imunossupressão. Os parâmetros bioquímicos permaneceram dentro dos valores de referência para todos os grupos tratados.

Para determinar a taxa de sobrevivência das cobaias foram acompanhadas por 28 dias contados a partir do primeiro dia da infecção. O tratamento foi iniciado 24 horas seguintes à infecção. Para o ácido gálico, após a infecção foram observadas mortes em todas as cobaias do grupo G2 entre o 3º e o 10º dia. Dois óbitos no grupo G3 no 8º dia, e um óbito no grupo G5 no quarto dia. Para o extrato bruto de *E. uniflora*, após a infecção foram observadas mortes em todas as cobaias do grupo G2 entre o 2º e o 11º dia. Três óbitos no grupo G3 no 7º dia, e um óbito no grupo G5 terceiro dia.

4.6 TOXIDADE

A toxicidade avaliada por dose letal (DL_{50}) foi determinada através de um total de oito ratos *Wistar* com média de peso de 200-250 g mantidos em jejum de 12 horas antes dos ensaios. Os animais receberam 5 g.Kg^{-1} da fração de *E. uniflora* por via oral, e foram acompanhados por 30 dias (PIRES et al., 2004).

A fração de *E. uniflora* que apresentou a melhor concentração *in vitro*, frente aos isolados de *C. glabrata* não apresentou toxicidade em teste *in vivo* por DL_{50} . Não foram observadas mortes nas cobaias (n=8) após a administração de 5 g.Kg^{-1} por via oral e acompanhados por 30 dias.

5 CONSIDERAÇÃO FINAL

As seis espécies de *Candida* apresentaram dose dependente, *in vitro*, ao fluconazol. Extratos obtidos das plantas medicinais do Nordeste brasileiro; folhas de *E. uniflora* L., *P. americana* Mill; e *P. guajava* L; cascas do caule de *L. ferrea* (Mart. ex Tul.), *E. uniflora* L; apresentam atividade antifúngica *in vitro*, frente as espécies de *Candida*, sendo os extratos de *E. uniflora* L. os que apresentaram maior atividade antimicótica. O extrato obtido de *E. uniflora* L. Apresentou menor atividade antimicótica, portanto melhores CIM frente isolados de *Candida* quando comparado com as outras espécies de plantas.

No modelo de candidemia experimental o extrato de *E. uniflora* apresentou resposta terapêutica mais efetiva do que fluconazol e com valores estatisticamente significantes, não apresentando toxicidade aguda em modelo animal. Entretanto, nenhum extrato apresentou sinergismo quando combinados com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol.

A combinação de extrato de *E. uniflora* L. com fluconazol se demonstrou aditiva para os cinco isolados de *Candida*, pois apresentando melhor resultados em *C. glabrata*, referente às outras espécies de *Candida*.

Do extrato de *E. uniflora* L. foi isolado Ácido gálico, onde apresentou capacidade antifúngica para os isolados das espécies de *Candida*, sendo melhor resultado em *C. glabrata* demonstrando relevância para futuras pesquisas na formulação para novos fármacos.

REFERÊNCIAS

- ABÍLIO, V. M. F.; MESQUITA, B. S.; SILVA, E. D.; CARVALHO, F. V. Q.; MACÊDO, L. L. A.; CASTRO, R. D. Atividade antifúngica de produtos naturais indicados por raizeiros para tratamento de candidíase oral. **Revista Cubana**, v. 51, n. 3, p. 259-269, 2014.
- ABRANTES, M. R.; LIMA, E. O.; MEDEIROS, M. A. P.; MENEZES, C. P.; GUERRA, F. Q. S.; MILAN, E. P. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre leveduras *Candida* não albicans. **Rev. Bras. Farm.**, v. 94, n. 3, p. 227–233, 2013.
- ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, S. A.; NATALIA, N. S. Ethnodirected research in the discovery of new drugs of medical and pharmaceutical interest: flaws and perspectives. **Braz. J. Pharmacogn.**, v.16, p.679-689, 2006.
- ALEXANDRER, B. D.; JOHNSON, M. D.; PFEIFFER, C. D.; JIMÉNEZ, C.; CATANIA, J.; BOOKER, R.; CASTANHEIRA, M.; MESSER, S. A.; PERLIN, D. S.; PFALLER, M. A. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of *FKS* mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. **Clin. Infect. Dis.**, v. 56, p. 1724–1732, 2013.
- ALMEIDA, D. J.; FARIA, M. V.; SILVA, P. R. Experimental biology in pitangueira: a review of five decades of scientific publications. **Ambiência.Guarapuava**, v. 8, p.177-193, 2012.
- ALMEIDA, L. F. D.; CANTI, Y. W. C.; VIANA, W. P.; LIMA, E. O. Screening da atividade antifúngica de óleos essenciais sobre *Candida albicans*. **Rev. Bras. Cienc. Saúde**, v.14, n. 4, p. 51-56, 2011.
- ALVES, C. T.; FERREIRA, I.; BARROS, L.; SILVA, S.; AZENEDO, J.; HENQUIQUES, E. M. Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against *Candida* species. **Future Microbiol.**, v.9, n. 2, p.139–146, 2014.
- ALVES, P. M. **Sobre microorganismos do biofilme dental e cepas do gênero Candida.** 2005. Dissertação - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2005.
- ANDRADE, M.; SILVA, M. D. C. *In vitro* antimicrobial activity of plant extracts against *Enterococcus faecalis*. **J. Bras.Patol. Med. Lab.**v. 46, n. 3, p. 175-180, 2010.
- ANGELETTI, S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical. **Journal of Microbiological Methods**, v. 138, p. 20-29, 2017.
- ANGELO, P.; MILENE, P.; NEUZA, J. Phenolic compounds in foods – A brief review. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p.1-9, 2007.
- ANWAR, K. P.; MALIK, A.; SUBHAN, K. H. Profile of candidiasis in HIV infected patients. **Iran J Microbiol.**, v. 4, p. 204–209, 2012.

ARAÚJO, A. A.; SOARES, L. A.; FERREIRA, M. R.; NETO, M. A., SILVA, G. R.; ARAÚJO, R. F.; GUERRA, G. C.; MELO, M. C. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and antiinflammatory activities of aqueous and acetone–water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 156, p. 88–96, 2014.

ARENDRUP, M. C.; Candida and candidemia: susceptibility and epidemiology. **Dan Med. J.** v. 60, n. 11, p. 46-98, 2013.

ATAIDES, F. S.; CHAUL, M. H.; EL ESSAL, F. E.; COSTA, C. R.; SOUZA, L. K.; FERNANDES, O. F.; SILVA M. R. Antifungal susceptibility patterns of yeasts and filamentous fungi isolated from nail infection. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 26, n. 12, p. 1479-1485, 2012.

AZEVEDO, C. F.; QUIRINO, Z. G. M.; BRUNO, R. L. A. Pharmacobotanical study of the aerial parts of Brazilian pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi.). **Rev. Bras. Plantas Med**, v.17, n.1, 2015.

BAGETTI, M. et Al. Physicochemical characterization and antioxidant capacity of pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). **Cienc.Tecnol.Aliment**, v.31, n.1, 2011.

BAILLY, S.; MAUBON, D.; FOURNIER, P.; PELLOUX, H.; SCHWEBEL, C.; CHAPUIS, C.; FORONI, L.; CORNET, M.; TIMSIT, J. F. Impact of antifungal prescription on relative distribution and susceptibility of *Candida* spp. e Trends over 10 years. **J Infect**, v.72, n. 1, p. 103-111, 2015.

BALDWIN, P. R.; REEVES, A. Z.; POWELL, K. R.; NAPIER, R. J.; SWIMM, A. I.; SUN, A.; GIESLER, K.; BOMMARIUS, B.; SHINNICK, T. M.; SNYDER, J. P.; LIOTTA, D. C.; KALMAN, D. Monocarbonylanalogs of curcumin inhibit growth of antibiotic sensitive and resistant strains of *Candida* spp . **Eur J Med Chem**, v. 92, p. 693-699, 2015.

BARNETT, J. A.; PAINE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and Identification**. Cambridge, Cambridge University Press, 2000.

BAYEGAN, S.; MAJOROS, L.; KARDOS, L.; KEMÉNY – BEKE, A.; MISZTI, C. *In vivo* studies with a *Candida tropicalis* isolate exhibiting paradoxical growth *in vitro* in the presence of high concentration of caspofungin. **J Microbiol**, v. 48, p. 170-173, 2010.

BENDAHA, H.; YU, L.; TOUZANI, R.; SOUANE, R.; GIAEVER, G.; NISLOW, C.; BOONE, C.; EL KADIRI, S.; BROWN, G. W.; BELLAOUI, M. New azole antifungal agents with novel modes of action: Synthesis and biological studies of new tridentate ligands based on pyrazole and triazole. **Eur J Med Chem.**, v. 46, n. 9, p. 4117-4124, 2011.

BEZERRA, J. E. F.; LEDERMAN, I. E. L.; SILVA JÚNIOR, J. F.; ALVES, M. A. Performance of surinam cherry (*Eugenia uniflora* L.) under irrigation in the Moxotó Valley, Pernambuco State, Brazil. **Rev. Bras. Frutic. Jaboticabal**, v.26, n.1, 2004.

BEZERRA, N. A.; FELISMINO, D. C.; CHAVES, T. P.; ALENCAR, L. C. B.; DANTAS, I. C.; SOBRINHA, L. C. Evaluation of antimicrobial activity of *Eugenia uniflora* L. **BioFar.**, v.08, n.2, p.40-48, 2012.

BISIGNANO, C.; FILOCAMO, A.; FAULKS, R. M.; MANDALARI, G. In vitro antimicrobial activity of pistachio (*Pistacia vera* L.) polyphenols. **FEMS Microbiol Lett**, v. 341, n. 1, p. 62–67, 2013.

BONAPACE, C. R.; WHITE, R. L.; FRIEDRICH, L. V.; BOSSO, J. A. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with Etest, time-kill, and *checkerboard* methods. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v.38, n1, p.43-50, 2000.

BRAGA, F. G.; MARIA, L. M. B.; RODRIGO, L. F. A.; MAGNUM, O. M.; FRANCIS, O. M. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **J Ethnopharmacol.**, v. 111, n. 2, p. 390-402, 2007.

BRAI, B. I.; ADISA, R. A.; ODETOLA, A. A. Hepatoprotective properties of aqueous leaf extract of *Persea Americana*, Mill (Lauraceae) 'avocado' against CCL4-induced damage in rats. **Afr J Tradit Complement Altern Med.**, v.11, n. 2, p. 237-244, 2014

BRUN, G. R. Caracterização química e atividade antimicrobiana do óleo volátil de pitanga (*Eugenia uniflora* L.). **Erechim Perspectiva**, v. 34, n. 127, p.135-142, 2010.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. AMGH editora Ltda, 12ª edição, 2012.

CARVALHO, M. G.; MELO, A. G. N.; ARAGÃO, C. F. S.; RAFFIN, F. N.; MOURA, T. F. A. L. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.15, n.1, p.158-169, 2013;

CASTRO, T. L.; COUTINHO, H. D. M.; GEDEON, C. C.; SANTOS, J. M.; SANTANA, W. J.; SOUZA, L. B. S. Mecanismos de resistência da *Candida* spp wwa antifúngicos. **Infarma** v. 18, n. 9, p. 10, 2006.

CAVALCANTI, Y.W.; ALMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W. W. N. Atividade antifúngica de tinturas de produtos naturais sobre *Candida* spp. **Int J Dent.**, v. 10, n. 1, p. 15-19, 2011.

CHAKRABARTI, A.; SHIVAPRAKASH, M. R. New Antifungal Agents in Pediatric Practice. **Indian Pediatrics**, v.46, p. 225-231, 2009.

CHAVES, G. M.; SANTOS, F. P.; COLOMBO, A. L. The persistence of multifocal colonization by a single ABC genotype of *Candida albicans* may predict the transition from commensalism to infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 198–204, 2012.

CLSI. **Reference method for broth dilution testing of yeasts: Approved standard-third edition M27-A3**. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute, 2008.

COELHO, A. G.; SCIO, E.; LIMA, I. V. A.; NOGUEIRA, M. Atividades antimicrobiana e antioxidante da *Chamomilla recutita* L. **Rev. HU.**, v.38, n.1, p.86-90, 2011.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; CAMARGO, L. F.; RICHTMANN, R.; QUEIROZ-TELLES, F. D.; SALLES, M. J.; CUNHA, C. A.; YASUDA, M. A.; MORETTI, M. L.; NUCCI, M. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: *Medicina Tropical*. **Braz J Infect Dis.**, v. 17, n. 3, p. 283-312. 2013.

CORRÊA, A. D.; BATISTA, R. S.; QUINTAS, L. E. **Plantas Mediciniais: do cultivo a terapêutica**. 7ª edição. Rio de Janeiro: Vozes, 2008. 248 p.

CORTI, M.; SOLARI, R.; DE CAROLIS, L.; CANGELOSI, D.; ARECHAVALA, A.; NEGRONI, R. Candida parapsilosis meningitis in a patient with AIDS: Report of a case and review of the literature. **Rev Iberoam Micol.**, v.30, p. 2, p. 122-124, 2013.

COSTA, M. P.; BOZINIS, M. C. V.; ANDRADE, W. M.; COSTA, C. R.; SILVA, A. L.; OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L.; FERNANDES, O. F. L.; SOUZA, L. K. H.; SILVA, M. R. R. Antifungal and cytotoxicity activities of the fresh xylem sap of *Hymenaea courbaril* L. and its major constituent fisetin. **BMC Complement Alternative Med.**, v. 14, n. 1, p. 245, 2014.

COSTA, L. M.; GUILHON, F.; SOUZA, T. P.; *Libidibia ferrea* (mart. ex tul) ferrea: pharmacological, phytochemical and botanical aspects. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci.**, v.7, n.4, p.48-53, 2015.

CRUZ, M. P.; ANDRADE, C. M.; SILVA, K. O.; SOUZA, E. P.; YATSUDA, R.; MARQUES, L. M.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M.; NAPIMOGA, M. H.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T. Antinoceptive and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract, fractions and flavones isolated from *mimosa tenuiflora* (willd.) poir (leguminosae). **Plos One**, v. 11, n. 3, 2016.

DIAS, O. J. Q. **Avaliação da eficácia do fitoterápico a base de cymbopogon citratus stapf em candidíase vaginal: estudo controlado, cego e randomizado**. Dados internacionais de catalogação na publicação. Universidade Federal do Ceará, 2014.

DICHTL, K.; SAMANTARAY, S.; WAGNER, J.; Sinalização da integridade da parede celular em fungos patogênicos humanos. **Célula. Microbiol**, 2016.

DICIAULA, M. C.; LOPES, G. C.; SCARMINIO, I. S.; MELLO, J. C. Optimization of solvent mixtures for extraction from bark of *Schinus terebinthifolius* by a statistical mixture-design technique and development of a UV-VIS spectrophotometric method for analysis of total polyphenols in the extract. **Química Nova**, v. 37, n. 158-63, 2014.

DIEKEMA, D.; ARBEFEVILLE, S.; BOYKEN, L.; KROEGER, J.; PFALLER, M. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 73, n. 1, p. 45-48, 2012.

DINIZ, M. F. F. M.; OLIVEIRA, R. A. G.; MEDEIROS, A. C. D.; MALTA, J. A. **Memento fitoterápico: As plantas como alternativa terapêutica: aspectos populares e científicos**. João Pessoa: EDUFPB, 1997. 205p.

DUARTE, M. R.; TOLEDO, M. G.; OLIVEIRA, R. B. Diagnose morfoanatómica de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae). **Visão Acadêmica**, v. 7, n. 2, p. 5-13, 2006;

DURÁN-VALLE, M. T.; GAGO, S.; GÓMEZ-LÓPEZ, A.; CUENCA-ESTRELLA, M.; JIMÉNEZ, D. C. L.; Recurrent episodes of candidemia due to *Candida glabrata* with a mutation in hot spot 1 of the *FKS2* gene developed after prolonged therapy with caspofungin. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 56, p. 3417-3419, 2012.

DZOYEM, J. P.; HAMAMOTO, H.; NGAMENI, B.; NGADJUI, B. T.; SEKIMIZU, K. Antimicrobial action mechanism of flavonoids from *Dorstenia* species. **Drug. Disc. Therap.**, v.7, n. 2, p.66-72, 2013.

ESCHSCHENAUER, G. A.; NGUYEN MH, S. S.; VAZQUEZ JA, M. A. J.; PASCULLE, W. A.; KUBIN, C. J.; KLINKER, K. P.; CARVER, P. L.; HANSON, K. E.; CHEN, S.; LAM, S.W.; CLANCY, C. J. Real-world experience with echinocandin MICs against *Candida* species in a multicenter study of hospitals that routinely perform susceptibility testing of bloodstream isolates. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 58, n. 1897–1906, 2014

FAVALESSA, O. C.; RIBEIRO, L.C.; TADANO, T.; FONTES, C. J. F.; DIAS, F. B.; COELHO, B. P. A. l.Primeira descrito da caracterizado fenotica e susceptibilidade in vitro a drogas de leveduras do genero *Candida* spp isoladas de pacientes HIV positivos e negativos, estado de Mato Grosso. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 42, n. 6, p. 661-665, 2010.

FALCÃO, T. R.; ARAÚJO, A. A.; SOARES, L. A. L.; RAMOS, R. T. M.; BEZERRA, I. C. F.; FERREIRA, M. R. A.; NETOMAS, ARAÚJO, R. F.; GUERRA, A. C. V. A.; MEDEIROS, J. S.; GUERRA, G. C. B. Crude extract and fractions from *eugenia uniflora* linn leaves showed anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial activities. **Bmc Complement Altern Med.**, v. 18, n. 84, 2018.

FALCI, D. R.; ROSA, F. B.; PASQUALOTTO, A. Comparison of nephrotoxicity associated to different lipid formulations of amphotericin B: a real-life study. **Mycoses.** v.58, n.2, p.104-12, 2015.

FALLER, A. L. K.; FIALHO, E. Polyphenol availability in fruits and vegetables consumed in Brazil. **Rev Saúde Pública**, v.43, n.2. p. 211-218, 2009.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5 ed., Brasília: **Anvisa**, 2010.

FEKKAR, A.; MEYER, I.; BROSSAS, J. Y.; DANNAOUI, E.; PALOUS, M.; UZUNOV, M.; NGUYEN, S.; DATRY, A. Rapid emergence of echinocandin resistance during *Candida kefyr* fungemia treatment with caspofungin. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 57, p. 2380–2382, 2013.

FERREIRA, M. R. A.; SANTIAGO, R. R.; LANGASSNER, S. M. Z.; MELLO, J.C.P.; SVIDZINSKI, T. I. E.; SOARES, L. A. L. Antifungal activity of medicinal plants from Northeastern Brazil. **J. Med. Plants Res.**, v.7, n.40, p. 3008-3013, 2013.

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

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v.42, n.2, p.168-194, 2006.

FREITAS, A. C. C.; XIMENES, N. C. A.; AGUIA, R. J. S.; NASCIMENTO, S. C.; LINS, T. U. L.; MAGALHÃES, L. R.; COELHO, L. C. B.; CARNEIRO, M. G.; GONÇALVES, T., CORREIA, M. T. S. Biological Activities of (*Caesalpinia*) *Libidibia ferrea*_var_*parvifolia*

(Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz Pod Preparations. **Evid. Based. Complement. Altern. Med.** p.1-7, 2012.

GALL, F.; COLELLA, G.; DI ONOFRIO, V.; ROSSIELLO, R.; ANGELILLO, I. F.; LIGUORI, G. *Candida* spp. in oral cancer and oral precancerous lesions. **New Microbiol.**, v. 36, p. 283–288, 2013.

GARCIA-EFFRON, G.; LEE, S.; PARK, S.; CLEARY, J. D.; PERLIN, D. S. Effect of *Candida glabrata FKS1* and *FKS2* mutations on echinocandin sensitivity and kinetics of 1,3-beta-D-glucan synthase: implication for the existing susceptibility breakpoint. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 53, p. 3690–3699, 2009.

GHOSH, S.; BANERJEE, S.; SIL, P. C. The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. **Food Chem Toxicol.**, v. 83, p. 111-124, 2015.

GLEHN, E. A. V.; RODRIGUES, G. P. S. Antifungigrama para comprovar o potencial de ação dos extratos vegetais hidroglicolicos sobre *Candida* sp. (Berkhout). **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.14, n. 3, p. 435-438, 2012.

GOULART, L. S.; TELES, H. L.; MENDES, V. A.; VIEIRA, M. C. S.; MOURA, S. V.; RAMON, J. L.; SOUZA, J. M.; VIEIRA, J. C. S.; CAMPOS, É. P. Antifungal prospecting in *Agonandra brasiliensis*. **Rev. Bras. Farm.**, v. 94, n. 3, p. 289–294, 2015.

GREATTI, V. R.; NEVES, F. T. A.; CORAL, D. J.; WECKWERTH, P. H. Antibacterial activity “*in vitro*” of mastic (*Schinus terebinthifolius*) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) strains against Gram positive and Gram negative. **Salusvita**, v. 33, n. 3, p.345-354, 2014.

GUERRA, A. C. V. A.; SOARES, L. A. L.; FERREIRA, M. R. A.; ARAÚJO, A. A.; ROCHA, H. A. O.; MEDEIROS, J. S.; CAVALCANTE, R. D. S.; JÚNIOR, R. F. A. *Libidibia ferrea* Presents Antiproliferative, Apoptotic and Antioxidant Effects in a Colorectal Cancer Cell Line. **Biomed Pharmacother**, v. 92, p. 696-706, 2017.

GUPTA, S. C.; PATCHVA, S.; KOH, W.; AGGARWAL, B. B. Discovery of Curcumin, a Component of the Golden Spice, and Its Miraculous Biological Activities. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v. 39, n. 3, p. 283–299, 2012.

HAKKI, M.; STAAB, J. F.; MARR, K. A. Emergence of a *Candida krusei* isolate with reduced susceptibility to caspofungin during therapy. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 50, p. 2522–2524, 2006.

HESPANHOL, F. L. Manifestações bucais em pacientes submetidos à quimioterapia. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.15, n. 1, p. 1085-1090, 2010.

HINRICHSEN, S. L. *Candida* isolates in tertiary hospitals in northeastern Brazil. **Braz J Microbiol.**, v. 40, p. 325-328, 2009.

HOFS, S.; MOGAVERO, S.; HUBE, B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. **J Microbiol.**, v. 54, n. 3, p. 149–169, 2016.

ISHIDA, K.; MELLO, J. C. P.; CORTEZ, D. A. G.; FILHO, B. P. D.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. **J Antimicrob Chemother**, v. 58, p. 942–949, 2006.

JANIQUES, A. G.; COSTA, P. R.; LEAL, V. O.; MOREIRA, N. X.; SILVA, A. A. M.; MAFRA D. Phenolic compounds: possible applicability in chronic kidney disease. **Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr./ J. Brazilian Soc. Food Nutr.**, v.38, n.3., p.322-337, 2013.

JESUS, N. Z. T.; LIMA, J. C. S.; SILVA, R. M.; ESPINOSA, M. M., MARTINS, D. T. O. Ethnobotanical survey of plants popularly used as anti-ulcer and anti-inflammatory in Pirizal, Nossa Senhora do Livramento, MT, Brazil. **Rev. bras. farmacogn. João Pessoa**, v.19, n.1., p. 130-139, 2009.

JIANG, C.; DONG, D.; YU, B., CAI, G.; WANG, X.; JI, Y.; PENG, Y. Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis* in China. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 4, p. 778–785, 2013.

JOHANN, S.; SÁ, N. P.; LIMA, L. A. R. S.; CISALPINO, P. S.; COTA, B. B.; ALVES, T. M.; SIQUEIRA, E. P.; ZANI, C. L. Antifungal activity of schinol and a new biphenyl compound isolated from *Schinus terebinthifolius* against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.**, v. 9, n.30, 2010.

KAJAL, A.; BALA, S.; SHARMA, N.; KAMBOJ, S.; SAINI, V. Therapeutic Potential of Hydrazones as Anti-Inflammatory Agents. **Int J Med Chem.**, p. 1-11, 2014.

KENIYA, M. V.; FLEISCHER, E.; KLINGER, R.; CANNON, R. D.; MONK, B. C. Inhibitors of the *Candida albicans* major facilitator superfamily transporter Mdr1p responsible for fluconazole resistance. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. 1-16, 2015.

KHANBABAEE, K. Teunis van. Tannins: Classification and Definition. **Natural Product Reports**, v.18, p.641-649, 2001.

KOŁACZKOWSKA, A.; KOŁACZKOWSKI, M. Drug resistance mechanisms and their regulation in non-*albicans* *Candida* species. **J Antimicrob Chemother**, v. 71, n. 6, p. 1438-50, 2016.

LAMBRECHT, F. R.; DALLABRIDA, J. P.; CUCHI, T.; SALAMONI, A. T. Influência do substrato na germinação e no desenvolvimento inicial de *Parapiptadenia rígida* (Bentham) Brenan. **Enciclopédia Biosfera**. v.11, p. 1217-1224, 2015.

LESJAK, P. F.; SANTOS, C. S.; COSTA, A. Binary and tertiary mixtures of *satyria hortensis* and *origanum vulgare* essential oils as potent antimicrobial agents against *helicobacter pylori*. **Phytotherapy Research**, 2015.

LEWIS, J. S.; WIEDERHOLD, N. P.; WICKES, B. L.; PATTERSON, T. F.; JORGENSEN, J. H. Rapid emergence of echinocandin resistance in *Candida glabrata* resulting in clinical and microbiologic failure. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 57, p. 4559–4561, 2013.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Antifungal activity from essential oils on *Candida* species. **Rev. Bras. Farmacogn.** v.16, n.2, p.197-201, 2006.

LIMA, L. B. et al. Acute and subacute toxicity of *Schinus terebinthifolius* bark extract. **J. Ethnopharmacol.**, v. 126, n.3, p. 468-73.

LIMA, R. F. L. et al. Antimicrobial and antiproliferative potential of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Evid Based Complement Alternat Med.**, 2014.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** v. 1. Nova Odessa: 1992; Plantarum, 352 p.

LYGODIUM, V. S. W. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas/39.** v. 12, n. 1, p. 38 – 43, 2013.

MACHADO H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S., OLIVEIRA, T. T. D. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, n.1-2, p. 33-39, 2002.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA- JR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARREIRO, R. O.; BANDEIRA, M. F. C. L.; SOUZA, T. P.; ALMEIDA, M. C.; BENDAHAM, K.; VENÂNCIO, G. N.; RODRIGUES, I. C.; COELHO, C. N.; MILÉRIO, P. S. L. L.; OLIVEIRA, G. P.; CONDE, N. C. O. Evaluation of the stability and antimicrobial activity of an ethanolic extract of *Libidibia ferrea*. **Clin.Cosmet.Investig. Dent.**, v.6, p. 9–13, 2014.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, M. J. Los flavonóides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutr Hosp.** v.17, n. 6, p.271-878, 2002.

MARTINEZ, L. R.; FRIES, B. C. Fungal Biofilms: Relevance in the Setting of Human Disease. **Curr Fungal Infect Rep.**, v. 4, n. 4, p. 266-275, 2010.

MARTINS, M.; UPPULURI, P.; THEMS, D. D.; CLEARY, I. A.; HENRIQUES, M.; LOPEZ-RIBOT, L.J.; OLIVEIRA, R. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* matrix and its contribution to biofilms. **Mycopathologia**, v. 169, n. 5, p. 323–331, 2010.

MAURYA V. et al. Oropharyngeal candidiasis and *Candida* colonization in HIV positive patients in northern India. **J Infect Dev Ctries.**, v. 7, p. 608–13, 2013.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.

MEDEIROS, K. C. P.; MONTEIRO, J. C.; DINIZ, M. F. F. M.; MEDEIROS, I. A.; SILVA B. A.; PIUVEZAM, M. R. Effect of the activity of the Brazilian polyherbal formulation: *Eucalyptus globulus* Labill, *Peltodon radicans* Pohl and *Schinus terebinthifolius* Radd in inflammatory models. **Bras Farmacogn.**, v. 17, p. 23-28, 2007.

MEDEIROS, C. D. *In vitro* antimicrobial activity of plant extracts of semi-arid region of Paraíba, PB, Brazil. **Odonto Cienc.** v.28, n.4, p.101-104, 2013.

MENEZES, T. O. et al. Virulence factors of *Candida albicans* isolates from the oral cavities of HIV-1-positive patients. **Curr HIV Res.**, v. 11, p. 304–8, 2013.

MENEZES, T. O. et al. Virulence factors of *Candida albicans* isolates from the oral cavities of HIV-1-positive patients. **Curr HIV Res.**, v. 11, p. 304–8, 2013.

MEYER, S. E.; FABIANO, E.; TIAN, R.; VAN, B. P.; SESHADRI, R., REDDY, T.; MARKOWITZ, V.; IVANOVA, N.; WOYKE, T. T.; HOWIESON, J. J.; KYRPIDES, N.; REEVE, W. High-quality permanent draft genome sequence of the *Parapiptadenia rigidanodulating Burkholderia* sp. strain UYPR1.413. **Stand Genomic Sci.**, v. 10, n. 31, p.1-8, 2015.

MOGHADAMTOUSI, S. Z.; KADIR, H. A.; HASSANDARVISH, P.; TAJIK, H.; ABUBAKAR, S.; ZANDI, K. A. Review on Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Activity of Curcumin. **BioMed Research International**, p. 1-12, 2014.

MOHAMMAD, Y.; SATTWIK, D. ; KHARYA, D. O. The phytochemical and pharmacological profile of *Persea Americana* Mill. **Pharmacog Rev.**, v. 4, p. 77–84, 2010.

MON CICERO, S. M. D. Teste de germinação de sementes de *Parapiptadenia rigida* (BENTH.) BRENAN (FABACEAE). **Rev Bras Sementes**, v.30, n.2, p.177-183, 2008;

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Quim. Nova**. v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MORAES, M. O.; BEZERRA, F. A. F.; LOTUFO, L. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A. Avaliação clínica da eficácia e segurança de fitoterápicos no Brasil. **Arq Bras Fitomed Cient.**, p. 30-39, 2004.

MORAIS-BRAGA, M. F. B.; SOUZA, T. M.; SANTOS, K. K. A.; GUEDES, G. M. M.; ANDRADE, J. C.; TINTINO, S. R.; COSTA, J. G. M.; MENEZES, I. R. A.; SARAIVA, A. Á. F.; COUTINHO, H. D. M. Atividade antibacteriana, antifúngica e moduladora da atividade antimicrobiana de frações obtidas de MURRAY. Jo. **Manual of clinical microbiology**, 9. ed. Washington: ASM. 2007.

MORAIS-BRAGA, M. F. B.; SOUZA, T. M.; SANTOS, K. K. A.; GUEDES, G. M. M.; ANDRADE, J. C.; TINTINO, S. R.; COSTA, J. G. M.; MENEZES, I. R. A.; SARAIVA, A. Á. F.; COUTINHO, H. D. M. Atividade antibacteriana, antifúngica e moduladora da atividade

antimicrobiana de frações obtidas de *Lygodium venustum* SW. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 12, n. 1, p. 157-162, 2013.

NEOFYTOS, D.; FISHMAN, J. A.; HORN, D.; ANAISSIE, E.; CHANG, C. H.; OLYAEIA, P. M.; STEINBACH, W. J.; WEBSTER, K. M.; MARR, K. A. Epidemiology and outcome of invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. **Transpl Infect Dis**, v. 12, n. 3, p. 220-229, 2010.

NEGRI, M.; SILVA, P. J.; SOUZA, C. V. Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. **Mycopathologia**, v. 169, p. 175-82, 2010.

NEGRI, M.; SILVA, S.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R. Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 31, n.7, p. 1399-412, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod.** v.75, n. 3, p. 311-335, 2012.

OBAYASHI, Y. T. S.; ALMEIDA, V. T.; BANDEIRA, T.; ALCÂNTARA, B. N.; SILVA A. S. B.; BARBOSA, W. R.; SILVA, P. B.; MONTEIRO, M. V. B.; ALMEIDA, M. B. Phytochemical evaluation and wound healing potential of the fruit extract ethanolic of Jucá (*Libidibia ferrea*) in Wistar rats. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.52, n.1, p.34-40, 2015.

OBOH, G.; ODUBANJO, V. O.; BELLO, F.; ADEMOSUN, A. O.; OYELEYE, S. I.; NWANNA, E. E.; ADEMILUYI, A. O. Aqueous extracts of avocado pear (*persea americana* mill.) leaves and seeds exhibit anti-cholinesterases and antioxidant activities in vitro. **J basic clin physiol pharmacol.**, v. 27, n. 2, p. 131-40, 2016.

OKUDAT, I. T. O. H. Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food PlantsHydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. **Molecules**, v. 16, p. 2191-2217, 2008.

OLIVEIRA, C. B.; SOARES, D. G. S.; MARÇAL, Q.; PADILHA, W. W. N. Antibacterial Activity in vitro of *Eugenia uniflora* L. (pitanga) against Cariogenic Bacteria. **R.Bras. Ci. Saúde**, v.12, n.3, p.239-250, 2008.

OLIVEIRA, G. P.; SOUZA, T. P.; CAETANO, S. K.; FARIAS, K. S.; VENANCIO, G. N.; BANDEIRA, M. F. C. L.; CONDE, N. C. O. Antimicrobial activity *in vitro* of extracts of the stem bark and fruit of *Libidibia ferrea* l. against microorganisms of the oral cavity. **Revista Fitos**, v. 8, n.2, p.73-160, 2013.

OLIVEIRA, J. L. F. G.; SANTOS, R. B.; REIS, F. O.; MATSUMOTO, S. T.; BISPO, W. M. S.; MACHADO, L. P.; OLIVEIRA, L. F. M. Efeito fungitóxico do óleo essencial de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius*RADDI) sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. **Rev. Bras. Pl. Med.** v.15, n.1, p.150-157, 2013.

PASSONE, M. A.; ETCHEVERRY, M. Antifungal impact of volatile fractions of *Peumus boldus* and *Lippia turbinata* on *Aspergillus* section *Flavi* and residual levels of these oils in irradiated peanut. **Int J Food Microbiol**, v. 168-169, p. 17-23, 2014.

PASSOS, X. S.; SALES, W. S.; MACIEL, P. J.; COSTA, C. R.; MIRANDA, K. C.; LEMOS, J. A.; BATISTA, M. A.; SILVA, M. R. R. Candida colonization in intensive care unit patients' urine. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 925-928, 2005.

PEIXOTO, J. V.; ROCHA, M. G.; NASCIMENTO, R. T. L.; MOREIRA, V. V.; KASHIWABARA, T. G. B. Candidiase - uma revisão de literatura. **Revista BJSCR**, v. 8, n. 2, p. 75-82, 2014.

PETERSEN, P. J.; LABTHAVIKUL, P.; JONES, C. H.; BRADFORD, P. A. *In vitro* antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by checkerboard and time-kill kinetic analysis. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 57, n. 3, p. 573-576, 2006.

PFALLER, M. A. Candida Bloodstream Infections: Comparison of Species Distributions and Antifungal Resistance Patterns in Community-Onset and Nosocomial Isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, p.561-566, 2011.

PFALLER, M. A. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. **The Am J of Medicine**, v.125, p.S3-S13, 2012.

RAMALINGUM, N.; MAHOMOODALLY, M. F. The therapeutic potential of medicinal foods. **Adv Pharmacol Sci.**, v. 2014, p. 1-13, 2014.

RATTMANN, Y. D.; SOUZA, L. M.; MALQUEVICZ-PAIVA, S. M.; DARTORA, N.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A.; IACOMINI, M. Analysis of Flavonoids from Eugenia uniflora Leaves and Its Protective Effect against Murine Sepsis. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v. 2012, p 1-9, 2012.

REIS, M. P.; CARVALHO, C. R.; ANDRADE, F. A.; FERNANDES, O. F.; ARRUDA, W.; SILVA, M. R. Fisetin as a promising antifungal agent against Cryptococcus neoformans species complex. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 2, p. 373-379, 2016.

SAEED A.; IFZAN-ARSHAD, M.; BOLTE, M.; FANTONI, A. C.; DELGADO-ESPINOZA, Z. Y.; ERBEN, M. F. On the roles of close shell interactions in the structure of acyl-substituted hydrazones: An experimental and theoretical approach. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.** v. 157, n. 15, p. 138-145, 2016.

SANTANA, B. F.; VOEKS, R. A.; FUNCH, L. S. Ethnomedicinal survey of a maroon community in Brazil's Atlantic tropical forest. **J Ethnopharmacol.** v. 181, p. 37-49, 2016.

SANTOS, P. M. L.; JAPP, A. S.; LIMA, L. G.; SCHRIPSEMA, J.; MENEZES, F. S.; KUSTER, R. M. A atividade antioxidante dos extratos de folhas de *Jacarandá puberula* Cham, Bignoniaceae, uma planta medicinal brasileira usada para depuração do sangue. **Rev Bras de Farmacogn.**, v. 20, n. 2, p. 147-53, 2010.

SARIGUZEL, F. M.; BERK, E.; KOC, A. N.; SAV, H.; DEMIR, G. Investigation of the relationship between virulence factors and genotype of Candida spp. isolated from blood cultures. **J Infect Dev Ctries**, v. 9, n. 8, p. 857-864, 2015.

SÁ, E. R. N.; MEDEIROS, C. S.; OLIVEIRA, J. R. M. S.; EVANGELISTA, A. J. J.; MAGALHÃES, M. I. S.; FILHO, G. A.; PAZ, A. M. R.; PESSÔA, H. L. F. “*In Vitro*” Antibacterial Activity of the Hidroalcoholic Extract of the *Schinus terebinthifolius* Raddi Barks. **Adv.Microb.** v.4, p.761-765, 2014.

SANGLARD, D.; COSTE, A.; FERRARI, S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 7, p. 1029-50, 2009.

SANTOS, C.; PATERSON, R.; VENANCIO, A.; NELSON, L. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **J. Appl. Microbiol.**, v. 108, n. 2, p. 375–385, 2010.

SANTOS, J. S.; MARINHO, R. R.; EKUNDI-VALENTIM, E.; RODRIGUES, L.; YAMAMOTO, M. H.; TEIXEIRA, S. A.; MUSCARA, M. N.; COSTA, S. K.; THOMAZZI S. M. Beneficial effects of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan extract on the inflammatory and nociceptive responses in rodent models. **J Ethnopharmacol.**, v. 148, n. 1, p. 218-222, 2013.

SANTOS, P. M. L.; JAPPA, S.; LIMA, L. G.; SCHRIPEMA, J.; MENEZES, F. S.; KUSTER, R. M. Atividade antioxidante dos extratos de folhas de Jacarandá puberula Cham., Bignoniaceae, uma planta medicinal brasileira usada para depuração do sangue. **Rev. Bras. de Farmacogn.**, v.20, n. 2, p. 147-153, 2010.

SARTORELLI, P.; SANTANA, J. S.; GUADAGNIN, R. C. et al. In vitro trypanocidal evaluation of pinane derivatives from essential oils of ripe fruits from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Quim Nova**, v. 35, n. 4, p. 743–747, 2012.

SAVINI, V.; CATAVITELLO, C.; MASCIARELLI, G.; ASTOLFI, D.; BALBINOT, A. O que sabemos sobre *Candida guilliermondii*? Uma viagem pela literatura passada e atual sobre essa levedura emergente. **Mycoses**, v. 54, p. 434-441, 2011.

SCHMIDT, C. A.; MURILLO, R.; BRUHN, T.; BRINGMANN, G.; GOETTERT, M.; HEINZMANN, B.; BRECHT, V.; LAUFER, S. A.; MERFORT, I. Catechin derivatives from *Parapiptadenia rigida* with in vitro wound-healing properties. **J Nat Prod.**, v. 73, n. 12, p. 2035-2041, 2010.

SCHUMACHER, N. S.; COLOMEU, T. C.; FIGUEIREDO, D.; CARVALHO, V. D. E. C.; CAZARIN, C. B.; PRADO, M. A.; MELETTI, L. M.; ZOLLNER, R. D. E. L. Identification and Antioxidant Activity of the Extracts of *Eugenia uniflora* Leaves. Characterization of the Anti-Inflammatory Properties of Aqueous Extract on Diabetes Expression in an Experimental Model of Spontaneous Type 1 Diabetes (NOD Mice). **Antioxidants (Basel)**, v. 4, n. 4, p. 662–680, 2015.

SHIELDS, R. K.; NGUYEN, M. H.; PRESS, E. G.; KWA, A. L.; CHENG, S.; DU, C.; CLANCY, C. J. The presence of an *FKS* mutation rather than MIC is an independent risk factor for failure of echinocandin therapy among patients with invasive candidiasis due to *Candida glabrata*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 56, p. 4862–4869, 2012.

SHIOZAWA, P.; CECHI, D.; FIGUEIREDO, M. A. P.; SEKIGUCHI, L. T.; BAGNOLI, F.; LIMA, S. M. R. R. Tratamento da candidíase vaginal recorrente: revisão atualizada. **Rev. Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa**, v. 52, n. 2, p. 48-50, 2007.

SILVA-ROCHA, W. P.; AZEVEDO, M. F.; FERREIRA, M. R. A.; SILVA, J. F.; SVIDZINSKI, T. I. E.; MILAN, E. P.; SOARES, L. A. L.; ROCHA, K. B. F.; UCHÔA, A. F.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; ALMEIDA, A. M.; CHAVES, G. M. Effect of the ethyl acetate fraction of *eugenia uniflora* on proteins global expression during morphogenesis in *candida albicans*. **Front microbiol.**, v. 26, n.8, p. 1788, 2017.

SILVA, S.; HENRIQUES, M.; MARTINS, A.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.; AZEREDO, J. Biofilms of non-Candida albicans Candida species: quantification, structure and matrix composition. **Med Mycol.**, v. 47, n. 7, p. 681-689, 2010.

SILVA, F. A. A.; SOUSA, J. P. B.; SOARES, S.; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; GREGÓRIO, L. E.; NANAYAKKARAC, N. P.; BASTOS, J. K. Antimicrobial Activity of the Extract and Isolated Compounds from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae) Z. **Naturforsch**, v.63, n.1-2, p.40-46, 2008.

SILVA, L. B.; ASSIS, F.; RIBEIRO, S. Estudo comparativo da madeira de *Mimosa ophthalmocentra* Mart. ex Benth e *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Fabaceae-Mimosoideae) na caatinga nordestina. **Acta Bot. Bras.** v. 25, n. 2, 2011.

SOARES, E. C. L.; COSTA, E. P.; SILVA, L. C. N.; ARAÚJO, J. M. Isolamento, Identificação e Atividade Antimicrobiana de *Streptomyces* sp. UFPEDA 968. **Scientia Plena**, v. 8, n. 12, 2012.

SOUZA, M. M.; OLIVEIRA, M. S.; ROCHA, M.; FURLONG, E. B. Avaliação da atividade antifúngica de extratos fenólicos de cebola, farelo de arroz e microalga *Chlorella pyrenoidosa*. **Ciênc.Tecnol.Aliment.**, v.30, n.3, p.680-685, 2010.

SOUZA, A. E.; PIMENTA, A. S.; FEIJÓ, F. M. C.; CASTRO, R. V. O.; FASCIOTTI, M.; MONTEIRO, T. V. C.; LIMA, K. M. G. Antibacterial and antifungal activities of pyroligneous acid from wood of *Eucalyptus urograndis* and *Mimosa tenuiflora*. **J Appl Microbiol**, v. 124, n. 1, p. 85-96, 2018.

SUN, K.; XIANG, L.; ISHIHARA, S.; MATSUURA, A.; SAKAGAMI, Y.; QI, J. Anti-aging effects of hesperidin on *Saccharomyces cerevisiae* via inhibition of reactive oxygen species and UTH1 gene expression. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 76, n. 4, p. 640-5, 2012.

TERRA JUNIOR, O. N.; MALDONADO, G. C.; ALFRADIQUE, G. R.; ARNÓBIO, A. Study of Acute Genotoxic Potential of an Aqueous Extract of *Schinus terebinthifolius* Raddi:an *in vivo* Micronucleus Assay. **Adv. Stud Biol**, v.7, n.8, p.35 – 364, 2015.

TESTONI, D.; SMITH, P. B.; BENJAMIN, J. R.; DANIEL, K. The Use of Antifungal Therapy in Neonatal Intensive Care. **Clin Perinatology**, v. 39, p. 83–98, 2012.

TROFA, D.; GÁCSEK, A.; NOSANCHUK, J. D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21:606-25, 2008.

ULYSSES, P. A.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, p. 678-689, 2006.

ULRICH-MERZENICH, P.; ZEITLER, H.; WAGNER, H. New Perspectives for synergy research Wilth the Omic- Tecnologis. **Phytomedicine**, v. 16, n.6, p. 495, 2009.

ULRICH-MERZENICH, G.; PANEK, D.; ZEITLER, H.; VETTER, H.; WAGNER, H. Drug development from natural products: exploiting synergistic effects. **Indian J Exp Biol.**, v. 48, n. 3, p. 208-19, 2010.

VALENCIA-GÓMEZ, L. E.; MARTEL-ESTRADA, S. A.; VARGAS-REQUENA, C.; RIVERA-ARMENTA, J. L. N. C.; OLIVAS-ARMENDÁRIZ, I. Chitosan/mimosa tenuiflora films as potential cellular patch for skin regeneration. *Int J Biol Macromol.*, v. 93, 1217-1225, 2016.

VEDIYAPPAN, G.; DUMONTET, V.; PELISSIER, F.; D'ENFERT, C. Gymnemic acids inhibit hyphal growth and virulence in *Candida albicans*. **PLoS One**, v.8, 2013.

VENÂNCIO, G. N.; RODRIGUES, I. C.; SOUZA, T. P.; MARREIRO, R. O.; BANDEIRA, M. F. C. L.; CONDE, N. C. O. Herbal mouthwash based on *Libidibia ferrea*: microbiological control, sensory characteristics, sedimentation, pH and density. **Odontol.** v. 44, n. 2, p. 118-124, 2015.

VERAS, H. N. H.; RODRIGUES, F. F. G.; COLARES, A. V.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M.; BOTELHO, M. A.; COSTA, J. G. M. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol. **Fitoterapia**, v. 83, p. 508–512, 2012.

VERMA, G.; MARELLA, A.; SHAQUIQUZZAMAN, M.; AKHTAR, M.; ALI, M. R.; ALAM, M. M. A review exploring biological activities of hydrazones. **J Pharm Bioallied Sci.** v. 6, n. 2, p. 69-80, 2014.

VIUDES, A.; COSTA, P. S.; SILVA, A. T. Candidemia at a terciary-care hospital: epidemiology, treatment, clinical outcome and risk factors for death. **Eur J Microbiol Infec Dis**, v. 21, p. 767-74, 2002.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; BARRA, K.; STRINGUETA, P. C. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Rev. Bras. Nutr. Clin.**, v. 23, n. 2, p. 141-149, 2008.