UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

MARIA AUDILENE DE FREITAS

ATIVIDADE ANTI-*Candida* E INIBIÇÃO DE BIOFILMES POR EXTRATOS DE *Licania rigida* Benth. E *Persea americana* Mill.

RECIFE
2020

MARIA AUDILENE DE FREITAS

ATIVIDADE ANTI-*Candida* E INIBIÇÃO DE BIOFILMES POR EXTRATOS DE *Licania rigida* Benth. E *Persea americana* Mill.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Micologia Aplicada

Orientadora: Profa. Dra. Rejane Pereira Neves

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Flaviana Bezerra Morais Braga

RECIFE

2020

Catalogação na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Freitas, Maria Audilene de
Atividade anti-*Candida* e inibição de biofilmes por extratos de *Licania Rigida Benth.* e *Persea americana* / Maria Audilene de Freitas. - 2020.

71 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Rejane Pereira Neves.
Coorientadora: Profa. Dra. Maria Flaviana Bezerra Morais Braga.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, Recife, 2020.
Inclui referências.

1. Micologia médica. 2. Fungos. 3. Candida. I. Neves, Rejane Pereira (orientadora). II. Braga, Flaviana Bezerra Morais (coorientadora). III. Título.

579.5 CDD (22.ed.) UFPE/CB-2021-306

ATIVIDADE ANTI-*Candida* E INIBIÇÃO DE BIOFILMES POR EXTRATOS DE *Licania rigida* Benth. E *Persea americana* Mill.

MARIA AUDILENE DE FREITAS

Aprovado em: 02/03/2020

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

_____

Dra. Rejane Pereira Neves – Orientadora
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto – Examinador Interno
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Dr. Cícero Pinheiro Inácio – Examinador Externo
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Dra. Maria Daniela Silva Buonafina – Examinador Externo
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Dr. Luiz Nascimento de Araújo Neto – Examinador Externo
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho aos meus pais, pelo apoio incondicional e pelos sacrifícios que fizeram por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concedido força, coragem, persistência e sabedoria para vencer todos os obstáculos que surgiram ao longo do caminho.

A minha família, meu pai Guilherme Freitas, minha mãe Francisca Soares, meu irmão Joseano Freitas por acreditarem em mim incondicionalmente, por valorizar cada etapa por mim vencida.

A minha Orientadora Profa. Dra. Rejane Pereira Neves, pelo acolhimento, oportunidade, confiança e aprendizado.

A minha Coorientadora Profa. Dra. Maria Flaviana Bezerra Morais Braga pela amizade, incentivo e colaboração, contribuindo fortemente para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho pela sua colaboração neste trabalho, sempre disposto a ajudar no que fosse necessário, por ter me apresentado o mundo das pesquisas e contribuído para meu crescimento cientifico e intelectual.

Aos membros da banca que se dispuseram a contribuir para o enriquecimento desse trabalho.

Aos meus companheiros de laboratório, Franz Graciano, Michellângelo Nunes, Melyna Chaves, Carlos Valeriano, Ana Paula Santiago, Bruna Sousa, Juciele Freitas, Ertênia Paiva, Luiz Neto, Daniela Bounafina e especialmente Adryelle Alves e Tatiana Oliveira pelos momentos de descontração, aprendizado e amizade.

As minhas amigas Jakiele Bem, Caciana Miranda, Eliane Freitas, Thassya Lucas, Jacqueline Andrade, Ana Raquel Silva, Moniele Neta pela amizade, incentivo e paciência.

As instituições de fomento, CAPES, FACEPE e CNPQ pelo finaciamento das pesquisas.

RESUMO

A elevada incidência de infecções por leveduras do gênero *Candida* associada ao uso indiscriminado dos agentes antifúngicos, tem causado preocupação devido a seleção de cepas resistentes, principalmente aos antifúngicos da classe dos azólicos. Desta forma, a busca por substâncias naturais, como extratos de plantas, com propriedades antifúngicas tem aumentado consideravelmente. Diante disso, este trabalho objetivou caracterizar a composição química e avaliar o potencial antifúngico do Extrato Etanólico das folhas de *Persea americana* e *Licania rigida*, verificando a ação destes na micromorfologia de *Candida*, bem como o potencial inibitório destes sobre células planctônicas e biofilmes de *Candida*. Na identificação dos constituintes químicos dos extratos foi utilizado o UPLC-QTOF-MS/MS. A atividade antifúngica *in vitro* foi determinanda pela Concentraçao Inibitoria Mínima (CIM) de acordo com os documentos M27-A3 e M27-S4 do *Clinical and Laboratory Standards Institute,* e verificada a Concentração Fungicida Minima (CFM), utilizando os isolados: *Candida krusei* URM6352, *C. krusei* URM4263, *C. krusei* URM5840, *C. albicans* URM5900, *C. krusei* URM5712, *C. albicans* ATCC90028, *C. tropicalis* URM5732, *C. tropicalis* INCQS40042 e *C. albicans* INCQS40006. Foi analisado o efeito modulador dos extratos associados ao Fluconazol. As alterações morfológicas e a mensuração dos filamentos das cepas foram observadas através da técnica de microcultivo em câmara úmida. A formação dos biofilmes foi induzida em discos de resina acrílica, e a quantificação foi realizada através da redução de sal tetrazólico (MTT). Para o tratamento dos mesmos, foram utilizados extratos Etanólico das Folhas de *P. americana* e *L. rigida* e fluconazol. Neste estudo, foram identificados dez constituintes químicos presentes no extrato de *P. americana* e seis no extrato de *L. rigida*. Nos testes de suscetibilidade *in vitro*, a menor CIM observada para o extrato de *Persea* foi de 64µg/mL em *Candida krusei* URM5840, para o fluconazol, as CIM variaram de 64 a 1µg/mL, e frente ao extrato de *Licania,* a CIM foi 32 µg/mL. A CFM do Extrato de *Licania* para o isolado *C. albicans* URM5900 foi de 512 µg/mL, para *C. krusei* URM5712 igual a 128 µg/mL, *C. krusei* URM4263, *C. krusei* URM5840 e *C. krusei* URM6352 CFM de 32 µg/mL e para o extrato de *Persea* com os isolados *C. krusei* URM6352 e *C. krusei* URM5840 foi igual a 32 µg/mL; frente a *C. krusei* URM6352 foi determinado CFM igual a 64 µg/mL. O extrato de *Licania* apresentou atividade sinérgica com fluconazol frente a cepa *Candida krusei* URM5712.

Os extratos das duas espécies vegetais revelaram-se efetivos na diminuição do processo de filamentação de algumas das cepas analisadas. Quanto a indução do biofilme, todos os isolados foram capazes de formar biofilme *in vitro* em 48 horas. O extrato de *L. rigida* demonstrou resultados significativos no tratamento do biofilme de algumas cepas analisadas. Portanto, os extratos testados revelaram atividade antifúngica *in vitro* contra as células planctônicas das espécies de *Candida*. O extrato de *Licania* expressou resultados mais significativos no processo de modulação, diferentemente do observado com o extrato de *Persea*. Ambos foram efetivos na diminuição do processo de filamentação de cepas utilizadas neste estudo. Portanto, a descoberta do potencial antifúngico destas espécies vegetais permite torná-las ferramentas promissoras como alternativa terapêutica para o tramento de pacientes com infecções causada por espécies de *Candida*.

Palavras-chave: *Licania rígida*; *Persea americana*; discos de resina acrílica; micromorfologia; biofilme; *Candida* sp.

ABSTRACT

The high incidence of yeast infections of the genus *Candida* associated with the indiscriminate use of antifungal agents, has caused concern due to the selection of resistant strains, mainly to antifungals of the azole class. Thus, the search for natural substances, such as plant extracts, with antifungal properties has increased considerably. Therefore, this work aimed to characterize the chemical composition and evaluate the antifungal potential of the Ethanolic Extract of *Persea americana* and *Licania rigida* leaves, verifying their action on Candida micromorphology, as well as their inhibitory potential on Candida planktonic cells and biofilms. In the identification of the chemical constituents of the extracts, UPLC-QTOF-MS / MS was used. The antifungal activity in vitro was determined by the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) according to documents M27-A3 and M27-S4 of the Clinical and Laboratory Standards Institute, and the Minimal Fungicidal Concentration (CFM) was verified, using the isolates: *Candida krusei* URM6352 , *C. krusei* URM4263, *C. krusei* URM5840, *C. albicans* URM5900, *C. krusei* URM5712, *C. albicans* ATCC90028, *C. tropicalis* URM5732, *C. tropicalis* INCQS40042 and *C. albicans* INCQS40006. The modulating effect of extracts associated with Fluconazole was analyzed. The morphological changes and the measurement of the strains' filaments were observed using the microculture technique in a humid chamber. The formation of biofilms was induced in acrylic resin discs, and quantification was performed by reducing the tetrazolic salt (MTT). For their treatment, ethanolic extracts of the leaves of *P. americana* and *L. rigida* and fluconazole were used. In this study, ten chemical constituents present in the extract of *P. americana* and six in the extract of *L. rigida* were identified. In in vitro susceptibility tests, the lowest MIC observed for *Persea* extract was 64µg / mL in *Candida krusei* URM5840, for fluconazole, MICs ranged from 64 to 1µg / mL, and compared to *Licania* extract, MIC was 32 µg / mL. The CFM of *Licania* Extract for the isolate *C. albicans* URM5900 was 512 µg / mL, for *C. krusei* URM5712 equal to 128 µg / mL, *C. krusei* URM4263, *C. krusei* URM5840 and *C. krusei* URM6352 CFM 32 µg / mL and for *Persea* extract with the isolates *C. krusei* URM6352 and *C. krusei* URM5840 was equal to 32 µg / mL; against *C. krusei* URM6352 CFM equal to 64 µg / mL was determined. The *Licania* extract showed synergistic activity with fluconazole against the strain *Candida krusei* URM5712. The extracts of the two plant species proved to be effective in reducing the filamentation process of some of the strains

analyzed. As for biofilm induction, all isolates were able to form biofilm in vitro within 48 hours. The extract of *L. rigida* demonstrated significant results in the treatment of the biofilm of some strains analyzed. Therefore, the extracts tested showed antifungal activity in vitro against planktonic cells of *Candida* species. The *Licania* extract expressed more significant results in the modulation process, differently from that observed with the *Persea* extract. Both were effective in decreasing the filamentation process of strains used in this study. Therefore, the discovery of the antifungal potential of these plant species allows them to become promising tools as a therapeutic alternative for treating patients with infections caused by *Candida* species.

Key-words: *Licania rigida*; *Persea Americana*; acrylic resin discs; micromorphology; biofilm; *Candida* sp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-*Persea americana* Mill. 21
Figura 2 -*Licania rigida* Benth 22
Figura 3 -Cromatografia líquida de alta performance com espectrometria de massa de alta resolução (UPLC-MS) do EEFPa em modo iônico negativo. 38
Figura 4 -Cromatografia líquida de alta performance com espectrometria de massa de alta ... 41
Figura 5 -Efeito Antifúngico do Extrato Etanólico das Folhas de *Persea americana* comparado com antifúngico padrão. FCZ: Fluconazole; *Candida krusei* URM4263; IC50 (µg/mL): Concentração Inibitória de 50% da cepa fúngica. p < 0,05 = *; p < 0,0001 = ****, quando comparado ao controle de FCZ. 46
Figura 6 -Efeito Antifúngico do Extrato Etanólico das Folhas de *Persea americana* comparado com antifúngico padrão. FCZ: Fluconazole; *Candida albicans* ATCC90028; IC50 (µg/mL): Concentração Inibitória de 50% da cepa fúngica. p < 0,05 = *; p < 0,0001 = ****, quando comparado com o controle de FCZ. 47
Figura 7 -Efeito Antifúngico do Extrato Etanólico das Folhas de *Licania rigida* comparado com antifúngico padrão. FCZ: Fluconazole; *Candida krusei* URM 5712; IC50 (µg/mL): Concentração Inibitória de 50% da cepa fúngica. p < 0,05 = *; p < 0,0001 = ****, quando comparado com o controle de FCZ. 47
Figura 8 -Efeito Antifúngico do Extrato Etanólico das Folhas de *Licania rigida* comparado com antifúngico padrão. FCZ: Fluconazole; *Candida albicans* ATCC90028; IC50 (µg/mL): Concentração Inibitória de 50% da cepa fúngica. p < 0,05 = *; p < 0,0001 = ****, quando comparado com o controle de FCZ. 47
Figura 9 -Efeito inibidor de transição morfológica de *Candida krusei* URM4263 pelo Extrato Etanólico das Folhas de *P. americana* (EEFPa). 49
Figura 10 -Efeito inibidor de transição morfológica de *Candida albicans* ATCC90028 pelo Extrato Etanólico das Folhas de *P. americana* (EEFPa). 49
Figura 11 -Efeito inibidor de transição morfológica de *Candida albicans* ATCC90028 pelo Extrato Etanólico das Folhas de *L. rigida* (EEFLr). 50
Figura 12 -Efeito inibidor de transição morfológica de *Candida albicans* URM5900 pelo Extrato Etanólico das Folhas de *L. rigida* (EEFLr). 51

Figura 13 -Efeito inibidor de transição morfológica de *Candida krusei* URM6352 pelo Extrato Etanólico das Folhas de *L. rigida* (EEFLr). 51
Figura 14 -Atividade oxidativa do tratamento de biofilme com Fluconazol (64µg/mL) e Extrato Etanólico das Folhas de *Persea americana* (EEFPa) (2048µg/mL) formado por leveduras clínicas do gênero *Candida*. Os dados representam a média e desvio padrão da absorbância do MTT durante a produção e tratamento dos biofilmes. Para a análise, o teste de comparações múltiplas de Tukey foi realizado para todas as médias obtidas ao nível de 5% de significância. Os símbolos "**", "***", "****" indicam diferenças significativas entre os tratamentos e controle com ($p \leq 0,001$), ($p \leq 0,0003$) e ($p \leq 0,0001$), respectivamente. 52
Figura 15 -Atividade oxidativa do tratamento de biofilme com fluconazol (64 µg / mL) e extrato etanólico de folhas de *Licania rigida* (EEFLr) (2048 µg / mL) formados por leveduras clínicas de *Candida*. Os dados representam a média e o desvio padrão da absorbância do MTT durante a produção e o tratamento de biofilme. Para a análise, foi realizado o teste de comparações múltiplas de Tukey para todas as médias obtidas no nível de significância de 5%. Os símbolos "*" e "****" indicam diferenças significativas entre tratamentos e controle com ($p \leq 0,05$) e ($p \leq 0,0001$), respectivamente. 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Análise de UPLC-ESI-QTOF-MS- Identificação de constituintes químicos do extrato de etanol de folhas de *Persea americana*.....39
Tabela 2- Análise de UPLC-ESI-QTOF-MS- Identificação de constituintes químicos do extrato de etanol de folhas de *Licania rigida*.....42
Tabela 3- Mostra a Concentração Inibitória Mínima (CIM) (µg / mL) de EEFPa e fluconazol antifúngico em relação aos isolados utilizados neste estudo.....44
Tabela 4- Mostra a Concentração Inibitória Mínima (CIM) (µg / mL) de EEFPa e fluconazol antifúngico em relação aos isolados utilizados neste estudo.....44

LISTA DE ABREVIATURAS

EEFPa	Extrato Etanólico das Folhas de *Persea americana*
EEFLr	Extrato Etanólico das Folhas de *Licania rigida*
UPLC- QTOF	Cromatografia Líquida de Ultraeficiência acoplada à sistema de quadrupolo/tempo de voo
URM	University Recife Micoteca
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qulidade em Saúde
ATCC	*American Type Culture Colletion*
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
YPD	Yeast Peptone Dextrose
PBS	Phosphate Buffered Saline
DMSO	Dimetilsulfóxido
NaCl	Cloreto de Sódio
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
MTT	(3-(4,5-dimetilazol-2yl)-di-fenil brometo de tetrazolina)
FCZ	Fluconazol
PDA	Potato Dextrose Ágar
IC50	Half maximal Inhbitory Concentration
CIM	Concentração Inibitória Minima
CFM	Concentração Fungicida Minima

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16

2 OBJETIVOS 18

2.2 Objetivo Geral 18

2.3 Objetivos Específicos 18

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 19

3.1 Produtos Naturais 19

3.2 Família *Lauraceae* 20

3.2.1 *Persea americana* Mill 20

3.3 Familia *Chrysobalanaceae* 22

3.3.1 *Licania rigida* Benth 22

3.4 Fungos 23

3.4.1 Gênero *Candida* 23

***3.4.2 Candida albicans* 24**

***3.4.3 Candida tropicalis* 25**

***3.4.4 Candida krusei* 25**

3.5 Biofilme 26

3.6 Antifúngicos 28

3.6.1 Fluconazol 29

3.7 Resistência a antifúngicos 30

4 MATERIAIS E MÉTODOS 32

4.1 Coleta e Identificação do Material Botânico 32

4.2 Preparo do Extrato 32

4.3 Identificação de compostos por Cromatografia Líquida de Ultraeficiência acoplada à sistema de quadrupolo/tempo de voo (UPLC-QTOF) 32

4.4 Cepas Utilizadas 33

4.5 Preparo do Inóculo para o teste de Sensibilidade 33

4.6 Teste de Sensibilidade Antifúngica 33

4.7 Determinação da Concentração Fungicida Mínima- CFM 34

4.8 Efeito Modulador do Extrato Etanólico das folhas de *Persea americana* e *Licania rígida* 34

4.9 Avaliação do efeito do EEFPa e do EEFLr sobre a virulência fúngica 34

4.10 Mensuração da Extensão das Estruturas Filamentosas 35

4.11 Preparo dos Discos de Resina Acrílica 35

4.12 Preparo das Soluções para o teste de Biofilme 35

4.13 Avaliação da capacidade de formação de Biofilme em Discos de Resina Acrílica 36

4.14 Tratamento do Biofilme 36

4.15 Análise Estatística 37

5 RESULTADOS 38

5.1 Identificação de compostos por Cromatografia Líquida de Ultraeficiência acoplada à sistema de quadrupolo/tempo de voo (UPLC-QTOF) 38

5.2 Teste de Sensibilidade Antifúngica 44

5.3 Determinação da Concentração Fungicida Mínima- CFM, Efeito modulador e avaliação do efeito do EEFPa e do EEFLr sobre a virulência fúngica. 46

6 DISCUSSÃO 54

7 CONCLUSÃO 58

REFERÊNCIAS 59

1 INTRODUÇÃO

O grupo de fungos pertencentes ao gênero *Candida* estão presentes na pele, boca, trato gastrintestinal e trato geniturinário de indivíduos saudáveis como comensais. Porém, sob certas circunstâncias, estes podem agir como agentes infecciosos, causando a candidíase (SALERNO et al., 2011). O desenvolvimento da candidíase se dá por uma série de fatores sistêmicos, que podem levar a um estado de imunossupressão, como radioterapia, quimioterapia, antibioticoterapia prolongada, diabetes, desnutrição, HIV. Existem também fatores que predispõem o desenvolvimento da candidíase como o tabagismo, doenças pré-existentes na mucosa oral, como neoplasias, higiene deficiente e prótese da cavidade oral mal adaptada (MELO et al., 2014).

No que se refere às neoplasias relacionadas à boca, essas afetam os lábios e o interior da cavidade bucal. Na cavidade oral devem ser observados lábios, mucosa bucal, mucosa jugal, língua, palato, gengiva, assoalho da boca, rebordo alveolar, área retromolar, amígdalas e glândulas salivares (SOUSA et al., 2008; CARMO et al., 2011) O palato duro geralmente é acometido por melanomas mucosos e pode ter origem no assoalho da cavidade nasal ou nos seios maxilares (NEVILLE et al., 2009). Às vezes é necessária uma intervenção cirúrgica, através da remoção do tumor, Além dos tratamentos de quimioterapia e radioterapia, esse tipo de procedimento, via de regra, gera mutilações temporárias ou definitivas para o paciente (HANNICKEL et al., 2002).

Com esse procedimento de retirada, para o paciente realizar suas atividades normais, é necessário à utilização de prótese. No entanto, o uso da prótese contribui inicialmente para a colonização e formação de biofilme por fungos, principalmente as leveduras do gênero *Candida*, pois essas próteses são preparadas a base de resina acrílica, e estas se mostram irregulares e com microporosidades que facilitam a colonização desses microrganismos. Estes microrganismos formam na superfície da prótese um biofilme semelhante ao biofilme dental, tanto na sua composição, quanto no seu processo de colonização (SESMA et al., 2011).

A formação desse biofilme é considerada um dos fatores de virulência mais importantes para as espécies de *Candida*, pois confere uma elevada resistência à terapia antifúngica por limitar a penetração de substâncias pela matriz e proteger as células contra a resposta imune do hospedeiro. Além disso, biofilmes formados por isolados de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C.*

glabrata e *C. tropicalis* têm sido associados com elevadas taxas de morbidade e mortalidade quando comparados com isolados incapazes de formar biofilmes (SILVA et al., 2012).

O uso desregrado de agentes antifúngicos, principalmente em países sem políticas de controle da dispensação desses fármacos, causa preocupações devido à seleção de cepas resistentes. Os estudos tem mostrado um aumento na incidência de infecções causadas por leveduras do gênero *Candida* que adquiriram resistência aos fármacos de primeira e segunda escolha (SAHU et al., 2013).

As dificuldades quanto ao tratamento, levaram a um aumento das pesquisas científicas com produtos naturais de origem vegetal na tentativa de obter substâncias antifúngicas (CLEFF et al. 2010). As plantas são utilizadas em sua grande maioria em extratos, que são preparações vegetais concentradas, obtidas através de estabilização, secagem ou moagem, e adicionadas a um solvente extrator (SIMÕES et al., 2003). Produtos naturais oriundos de plantas têm sido cada vez mais estudados e considerados como potenciais fontes de novos compostos com atividade antimicrobiana (MESSIER, et al., 2011).

Nesse grupo de plantas, *Persea americana* Mill. (Lauraceae), Conhecida popularmente como abacateiro, é utilizada como alimento, entretanto, esta espécie também é utilizada na medicina popular como diurética e para o tratamento de processos inflamatórios (MARQUES, 2001), como calmante e ativador das funções hepáticas (MARQUES, 2001; ADEYEMI et al., 2002) e no tratamento de micoses e infecções parasitárias (LEITE et al., 2009).

Licania rigida Benth, conhecida popularmente como oiticica, (Chrisobalanaceae), apresenta hábitos arbóreos ou arbustivos, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (CORRÊA; PENNA, 1984). Existem trabalhos que mostram que está possui atividade antimicrobiana (FARIAS et al., 2013; MORAIS, 2015).

Têm sido crescentes os estudos da atividade antimicrobiana de produtos naturais, e principalmente no Brasil, por ser um país com uma grande diversidade de plantas. Diante do exposto, o presente trabalho buscou avaliar a atividade antifúngica dos extratos etanólicos das folhas de *P. Americana* e *L. rigida*, caracterizar sua composição química, verificar seu potencial na inibição da morfogênese de *Candida* sp., bem como avaliar seu efeito no tratamento do biofilme formado.

2 OBJETIVOS

2.2 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antifúngica dos extratos etanólicos das folhas de *P. Americana* e *L. rigida*, caracterizar sua composição química, verificar seu potencial na inibição da morfogênese de *Candida* sp., bem como avaliar seu efeito no tratamento do biofilme formado.

2.3 Objetivos Específicos

- Analisar os constituintes químicos dos extratos das folhas de *Persea americana Licania rigida* por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Ultraeficiência acoplada à sistema de quadrupolo/tempo de voo (UPLC-QTOF);
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos frente às cepas *Candida* em estudo;
- Determinar a Concentração Fungicida Mínima dos extratos frente às cepas em estudo;
- Verificar o efeito sinérgico dos extratos;
- Induzir a formação de Biofilme;
- Tratar o biofilme com Fluconazol e com os extratos de *P. americana* e *L. rigida*;
- Averiguar a ação dos extratos sobre a morfologia de *Candida*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Produtos Naturais

Produtos naturais são substâncias químicas encontradas em plantas, animais, fungos, que possuem atividade biológica. Estes compostos são utilizados por esses seres vivos para sua defesa, metabolismo e desenvolvimento (CRAGG e NEWMAN, 2013). A utilização dos produtos naturais vem acontecendo há milhares de anos por populações de diversos países para tratar de diversas patologias. São utilizados pela população como forma alternativa ou complementar aos medicamentos sintéticos (CALIXTO, 2005; VEIGA-JUNIOR & MELLO, 2008).

As plantas são fontes de diversas substâncias que são utilizadas no tratamento das doenças (MONTOVANI et al., 2009). Por representarem uma fonte alternativa de compostos antimicrobianos e pela possibilidade de serem empregados como fitofármacos, as plantas medicinais e produtos vegetais estão dentre os produtos naturais de grande interesse cientifico. Apresentam uma variedade de constituintes, que proporcionam grandes chances de obterem moléculas com novas estrutura baseadas em carbono (MICHELIN et al., 2005).

Os vegetais mostram uma grande capacidade de sintetizar metabólitos secundários, tanto em relação ao número de substâncias produzidas, quanto á sua diversidade numa mesma espécie (SIMÕES et al., 2007). Esses metabolitos secundários podem ser compostos químicos de estruturas complexas, como alcaloides, flavonoides, taninos, cumarinas, glicosídeos, terpenos, fenilpropanóides entre outros, e a esses compostos tem sido atribuída a atividade antimicrobiana das plantas (SOKOVIĆ et al., 2013).

Os microrganismos vem desenvolvendo resistência aos antimicrobianos já utilizados na terapêutica, tornando-se cada vez mais necessária a pesquisa de novos agentes para o combate de infecções. Compostos constituídas por extratos brutos ou compostos biologicamente ativos isolados de espécies vegetais usadas na medicina popular apresentam-se como fontes promissoras para a pesquisa de novos fármacos antimicrobianos (AL-FATIMI et al., 2007). Estas substâncias também interagem de maneira sinérgica com outras aumentando ou potencializando a ação da droga antimicrobiana (COUTINHO et al., 2004).

As plantas medicinais são consideradas fontes acessíveis de cuidados de saúde primários para cerca de 80% da população de países em desenvolvimento, por se apresentarem como uma fonte acessível de cuidados primários com a saúde. Estima-se que, 50% das drogas ocidentais

apresentam fitoconstituintes vegetais ou derivados sintéticos de fitoconstituintes, medicamentos comercialmente comprovados usados nas práticas modernas foram inicialmente usadas em várias formas tradicionais ou práticas de cura popular na forma bruta (PARAAKH e RAVICHANDRA, 2016). O Brasil é um país rico em diversidade cujo território possui cinco principais biomas sendo, portanto, uma rica fonte de produtos terapêuticos. No entanto, este potencial para a descoberta de plantas como fonte de novas drogas é pobremente explorado ou regulamentado (CALIXTO, 2000; RATES, 2001; VEIGA-JUNIOR, 2008).

É necessário ressaltar que as substâncias naturais, mesmo considerados terapêuticos, também podem causar efeitos indesejados ou tóxicos (AGRA et al., 2007). A utilização moderada e racional das plantas medicinais, seja como suporte para o desenvolvimento de novos fármacos seja como terapia de fato, é simples, barata e bastante eficaz para promover os cuidados da saúde (CORRÊA, 2008).

3.2 Família *Lauraceae*

A família Lauraceae é pantropical, apresenta membros nas regiões temperadas, mas é bem representada nas Américas, Ásia Tropical, Austrália e Madagascar, e é inexpressiva no sul da África. Estima-se entre 2500 a 3500 o número de espécies, distribuídas em 50 gêneros (ROHWER, 1993).

No Brasil, a família é reconhecida por 23 gêneros e 434 espécies, dos quais 18 gêneros e 125 espécies foram citados para a região Nordeste do Brasil (QUINET et al. 2012). Essa família é composta principalmente por árvores, exceto pelo gênero *Cassytha*, que é uma erva parasita (QUINET et al., 2002). Além da importância ecológica, a família Lauraceae é muito explorada comercialmente por possuir madeira de boa qualidade e fornecer ainda óleos essenciais e alcalóides empregados na perfumaria, cosmetologia e na fabricação de fármacos (MARQUES, 2001).

3.2.1 *Persea americana* Mill

Nativa das regiões tropicais e subtropicais do México, Guatemala e Costa do Pacífico da América Central, é uma árvore frutífera, conhecida popularmente no Brasil como abacateiro (fig.1). Pertence à família Lauraceae, sendo que está abrange 50 gêneros e cerca de 2500 espécies distribuídas em todo o mundo (ALCARAZ et al., 2013).

O fruto apresenta-se oval ou arredondado, comestível, tendo coloração verde-amarelada (ALONSO, 2004). As folhas possuem efeito antiviral (ALMEIDA et al., 1998),

antiinflamatório e analgésico (ADEYEMI et al., 2002), anticonvulsivante (OJEWOLE et al., 2006) e regulador das taxas de glicose e colesterol no sangue (BRAI et al., 2007) e pressão arterial (OWOLABI et al., 2005), sendo utilizadas também no tratamento de micoses e infecções parasitárias (LEITE et al., 2009).

Figura 1-*Persea americana* Mill.

Fonte: http//arbolesornamentales.es

Estudos com o fruto imaturo e a polpa demonstraram eficácia no tratamento antitumoral (ALONSO, 2004), além de desempenharem um efeito larvicida (ROSALINDA et al, 2014) mais potente que a rotenona (inseticida usado no combate a mosquitos) contra larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus* (CARVALHO et al., 2011).

3.3 Familia *Chrysobalanaceae*

Essa família é composta por 17 gêneros e cerca de 450 espécies com hábitos arbustivo e arbóreo, encontram-se distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais (BRUMMITT, 1992). As espécies da família Chrysobalanaceae possuem uma ampla variedade de hábito podendo ser encontradas como arbustos e árvores. Na medicina popular, espécies da família Chrysobalanaceae são usadas com diversas finalidades, como as espécies do gênero Parinari, que são utilizadas na África para tratamento da malária (GESSLER et al., 1995).

3.3.1 *Licania rigida* Benth

Licania rigida Benth, conhecida popularmente como oiticica (fig. 2), pertence à família Chrysobalanaceae da ordem Rosales e superordem Rosifloraceae, compostas por 17 gêneros e cerca de 450 espécies com hábito arbustivo e arbóreo distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (CORRÊA et al., 1984).

Figura 2 -*Licania rigida* Benth

Fonte: http//cnip.org.br

Esta espécie é utilizada na medicina popular para tratamento do diabetes, com seus efeitos hipoglicemiante e diurético comprovados farmacologicamente (PRESTA, 1987) possui também atividade antimicrobiana (FARIAS et al., 2013; MORAIS, 2015).

3.4 Fungos

O reino Fungi (Eumycota) está atualmente subdivido em sete filos: Microsporidia, Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota, sendo estes dois últimos incluídos no sub-reino Dikarya (HIBBET et al., 2007).

Estima-se que na natureza exista cerca de 1,5 milhões de espécies fúngicas, porém somente cerca de 100 mil foram descritas até o momento (ABREU et al., 2015). Os fungos podem ser unicelulares, como as leveduras, ou multicelulares, como os cogumelos e os fungos filamentosos (MURRAY, 2014). Estes podem interagir com plantas, animais e ainda com seres humanos, de diversos modos estabelecendo relacionamentos simbióticos, comensais ou patogênicos (ROMANI, 2011).

Fungos podem assumir diferentes papéis junto à espécie humana. Enquanto comensais associam-se ao hospedeiro sem prejudicá-lo e enquanto parasitas, existem espécies que podem se comportar como parasitas obrigatórios, facultativos ou ocasionais e, dependendo do seu potencial invasor e de virulência, acarretam morbidade que podem variar no que diz respeito à intensidade e gravidade (MORAES et al., 2008). As infecções causadas por fungos são denominadas micoses, em sua grande maioria não são contagiosas, mas adquirida por exposição do indivíduo a uma fonte natural de ocorrência do fungo (SIDRIM & ROCHA, 2004).

3.4.1 Gênero *Candida*

De acordo com a organização taxonômica, as espécies do gênero *Candida*, localizam- se em: Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Saccharomycetes, Ordem Saccharomycetales, Família Saccharomycetaceae (BUTLER, 2010).

Existem mais de 200 espécies de *Candida*, destas, menos de 20 estão associadas à micoses superficiais ou invasivas em seres humanos. Dessas espécies, apenas cinco são responsáveis por mais de 90% das infecções invasivas por *Candida*: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis*. Outras menos frequentes são: *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. norvegensis*, *C. dubliniensis*, *C. lipolytica*, *C. zeylanoides*, *C. pelliculosa* entre outras (SARDI et al., 2013; YAPAR et al., 2014).

O gênero *Candida* apresenta inúmeras estratégias que auxiliam na sua colonização, invasão e patogênese, apresentando diferentes fatores de virulência e a expressão destes pode variar, pois depende da espécie responsável pela infecção, da origem geográfica e do tipo, local e estágio da infecção (DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014). Os fatores de virulência

apresentados por esse gênero são diversos, dentre eles, um dos principais é a formação de biolfilme (SARDI et al., 2013).

As infecções causadas por espécies de *Candida* acometem geralmente pacientes com comprometimento do sistema imunológico, usuários de nutrição parenteral e antibióticos de amplo espectro, de cateteres intravenosos ou que se submetem a quimioterapia citotóxica e a transplante de órgãos (ORTEGA et al., 2011).

3.4.2 Candida albicans

C. albicans apresenta-se na forma de blastoconídeos globosos, ovóides, cilíndricos e alongados em condições saprobióticas, estando associado à colonização assintomática; já em processos patogênicos apresenta pseudo-hifas e hifas verdadeiras na forma filamentosa. Este fungo apresenta como principais fatores de virulência a aderência, dimorfismo (formação de micélio), variabilidade fenotípica (*switching*), produção de toxinas e enzimas extracelulares (DALAZEN, 2010). Está distribuída amplamente na natureza, ao contrário de outras espécies do gênero que tem distribuição limitada (ÁLVARES et al., 2007).

C. albicans é a espécie de maior relevância em função da sua prevalência tanto em hospedeiros hígidos como aqueles com alguma alteração na imunidade (BARBEDO & SGARBI, 2010). É um Fungo ubíquo que pode causar sérias infecções com risco de vida para pacientes suscetíveis. Esta espécie faz parte da microbiota natural humana, que, pode ser isolado de trato gastrointestinal, vagina e boca em indivíduos saudáveis, entretanto quando a barreira anatômica sofre dano ou quando o hospedeiro se apresenta imunossuprimido, então, pode se tornar uma fonte de infecção fúngica invasiva (TAN et al., 2014).

Um dos principais mecanismos de virulência deste fungo é a sua versatilidade de adaptação e capacidade de adesão em sítios variados, principalmente, a formação de comunidades microbianas aderidas a diversas superfícies, denominadas biofilmes (SUZUKI, 2009). *C. albicans* produz biofilmes completamente estruturados apresentando vários tipos de células encapsuladas numa matriz extracelular (RAMAGE et al., 2005; RAMAGE et al., 2009; FOX et al., 2012). A matriz desse biofilme é complexa, com os principais constituintes polissacarídicos sendo α-manana, β-1,6 glucana e β-1,3 glucana (HALL et al., 2013; MITCHELL et al. 2015). Essa matriz lhes confere uma significante resistência à terapia antifúngica, limitando a penetração destas substâncias através da mesma (DONLAN et al., 2002; MUKHERJEE et al. 2004).

3.4.3 Candida tropicalis

Candida tropicalis tem sido considerada como uma das espécies mais importantes de *Candida* em termos de epidemiologia e virulência. Apresenta a capacidade de produzir hifas verdadeiras, uma propriedade exclusiva de *Candida albicans* e da espécie *Candida dubliniensis* (MARCOS-ZAMBRANO et al., 2014). É considerada uma espécie que causa candidíase invasiva grave. As infecções causadas por essas espécies podem ser adquiridas de duas formas: endogenamente, quando o fungo já se encontra colonizando o hospedeiro, sendo esta considerada a principal via de infecções, e exogenamente, por meio do contato com pessoas ou fômites contaminados (NEGRI et al., 2012).

Esta espécie é encontrada em indivíduos neutropênicos que passaram ou estão passando por terapia intensiva para tratamento de câncer, os que passaram por tratamentos no qual se fazia necessário o uso de cateteres por longos períodos, aqueles que fizeram uso de antibioticoterapia prolongada, pacientes com *diabetes melitus*, os com idade avançada ou algumas das situações combinadas (DEORUKHKAR et al., 2014; NEGRI et al., 2010).

Como um dos fatores de virulência, *Candida tropicalis* apresenta alta capacidade de formação de biofilme, O biofilme de *C. tropicalis* corresponde a uma rede de leveduras, pseudo hifas e hifas, que confere a esta vantagens em relação às defesas do hospedeiro, resistência antifúngica significativa, estabelece um reservatório que favorece reinfecções e tem acarretado maior morbidade e taxas de mortalidade (DEORUKHKAR et al., 2014; BIZERRA et al., 2008).

3.4.4 Candida krusei

A espécie *C. krusei* demonstra alta capacidade de formar biofilme espesso e com várias camadas de pseudo-hifas incorporadas à uma matriz polimérica (PANNANUSORN et al., 2013), entretanto, a sua adesão não é muito comum em superfícies biológicas quando comparada à de outras espécies do mesmo gênero. Diferentes estudos realizados (OLIVEIRA et al., 2014; PFALLER et al., 2014; CASTRO et al., 2016) também mostram que a adesão de *C. krusei* em superfícies de acrílico é menor em comparação com diferentes espécies do gênero, incluindo *C. albicans*.

Esses achados corroboram com os de outros estudos, que relataram espécies de *Candida* menos patogênicas, como *C. krusei*, que exibe um bom crescimento de biofilme na superfície de discos de cateter de PVC (THEIN; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2007) o que indica que a taxa de ocorrência e os casos de resistência dessa espécie não-albicans necessitam de mais estudos (OLIVEIRA et al., 2014; PFALLER et al., 2014; CASTRO et al., 2016).

Candida krusei é um patógeno oportunista que se mostra intrinsecamente resistente ao fluconazol. Sendo a infecção dessa levedura associada ao uso profilático ou terapêutico desse agente antifúngico (ABBAS et al., 2000; SPANAKIS et al., 2006). Dois mecanismos de resistência a azóis em *C. krusei* foram descritos: superexpressão de bombas de efluxo de drogas (VENKATESWARLU et al., 1996) e sensibilidade diminuída da enzima alvo, a 14-desmetilase de esterol citocromo P450 (codificada pelo gene CYP51) (OROZCO et al., 1998).

Apesar da resistência intrínseca ao fluconazol, *C. krusei* se mostra suscetível ao voriconazol *in vitro*, que se correlaciona com a ligação deste fármaco à enzima alvo (FUKUOKA et al., 2003). Apresenta baixa sensibilidade a anfotericina B. O fenótipo de multirresistência exibido por *C. krusei* é um problema para o tratamento de pacientes em geral, principalmente grupos comprometidos (neutropênicos, com hanseníase, com leucemia, HIV-positivo, dentre outros) (PFALLER et al., 2008).

3.5 Biofilme

Os biofilmes são definidos como sendo uma comunidade séssil, caracterizada por células que formam microcolônias, irreversivelmente aderidas a um substrato, a uma interface, ou ainda, umas às outras, embebidas numa complexa matriz extracelular de substâncias poliméricas, exibindo um fenótipo alterado no que diz respeito à taxa de crescimento microbiano e à transcrição genética (BOLES et al., 2011).

A formação do biofilme em *Candida* ocorre em três fases de desenvolvimento, primeira, a adesão dos micro-organismos a uma superfície biótica ou abiótica específica; a segunda, a formação de colônias discretas e a organização das células; terceira, secreção de matriz de polissacarídeo extracelular, maturação em uma estrutura tridimensional disposta espacialmente e disseminação de células do biofilme (CHANDRA et al., 2001). Sabe-se que os biofilmes representam o tipo de crescimento microbiano predominante na natureza e são cruciais no desenvolvimento de infecções, uma vez que servem de nicho aos agentes patogênicos (DONLAN, 2001).

Os microrganismos são ubiquitários, por tanto, os biofilmes podem se formar em qualquer superfície e qualquer ambiente. Como algumas espécies de *Candida* são frequentemente encontradas na microbiota humana normal, torna-se mais fácil a sua interação com a maioria dos biomateriais implantados e superfícies do hospedeiro. Observa-se a formação de biofilme por *Candida* spp. em diversos dispositivos como *stents, shunts*, próteses, implantes, tubos endotraqueais, marcapassos e vários tipos de cateteres. (KOJIC, 2004).

A maioria das informações sobre a formação de biofilmes de *Candida* provém de experimentos com uma variedade de substratos (plástico, acrílico, poliestireno, substratos de germânio, celulose), e próteses em geral, implantes, tubos endotraqueais, cateteres, dentre outros, são alguns exemplos de estruturas que podem ser colonizadas por biofilmes de *Candida* (RAMAGE et al., 2005).O biofilme de próteses dentárias está intimamente relacionado à processos inflamatórios do tipo estomatite, causada principalmente pela presença de leveduras do gênero *Candida*, sendo que sua presença no biofilme é o principal fator para o aparecimento da doença, o que ocorre devido ao seu poder de adesão às superfícies (FIGUEIRAL et al., 2007; SESMA, 2011).

Espécies de *Candida* não- *C. albicans* também são relacionadas a formação de biofilme, tais como *C. tropicalis, C. glabrata, C. krusei, C. parapsilosis, C. guilliermondii, C dubliniensis, C. lipolytica, C. famata, C. pulcherrima, C. sake e C. pseudotropicalis* (ZOMORODIAN et al., 2011). Segundo a literatura o alto índice e maior percentagem de produção de biofilme por leveduras não-*albicans*, ocorre nos pacientes portadores de prótese, que apresentavam lesões na cavidade oral (LYON; RESENDE, 2006).

O biofilme tem sido relacionado e considerado como um dos fatores para candidose, conhecida como estomatite por dentaduras ou estomatite protética em portadores de prótese total, que é outra forma de manifestação clínica da colonização por *Candida* spp. na cavidade oral (SILVA, 2010).

Alguns fatores influenciam a formação e a estrutura do biofilme de *Candida* spp., tais como o substrato em que é formado, as condições de crescimento (temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes), transição de leveduras para hifas e a espécie envolvida (SILVA-DIAS et al., 2015).

Os mecanismos de resistência dos biofilmes a agentes antimicrobianos ainda não foram bem compreendidos, no entanto, vários mecanismos foram sugeridos para explicar o aumento da resistência dos biofilmes aos antifúngicos, dentre esses tem-se a restrita penetração da droga através da matriz, densidade celular, alteração de alvos das drogas, expressão de bombas de efluxo e presença de células persistentes (DOUGLAS, 2002; RAMAGE et al., 2002; MUKHERJEE et al., 2004; RAMAGE et al., 2012).

Embora a resistência ao biofilme seja multifatorial, a proteção exercida pela matriz é um contribuinte importante para os altos níveis de resistência exibidos por biofilmes (PIERCE, 2017). Existem trabalhos que mostram a correlação entre a abundância da matriz e os níveis de resistência ao fluconazol e anfotericina B (AL-FATTANI et al., 2006; BAILLIE et al., 2000).

Resultados de experimentos de teste de suscetibilidade usando células desagregadas dos biofilmes também indicaram uma contribuição da matriz para a resistência (RAMAGE et al., 2002). O β-1,3 glucano tem um papel fundamental na matriz exopolimérica para a resistência dos biofilmes ao fluconazol - principalmente por meio de um mecanismo de sequestro de drogas, pelo qual a ligação a esse componente da matriz impede que a droga atinja seus alvos celulares (NETT et al., 2007; TAFF et al., 2012).

3.6 Antifúngicos

Os antifúngicos podem ser agrupados em quatro classes principais de acordo com seu mecanismo de ação. O grupo dos poliênicos, que atuam na membrana plasmática; as pirimidinas atuam promovendo a inibição da síntese de ácidos nucleicos; azólicos, que interferem na síntese de Ergosterol (principal esterol dos fungos) e as equinocandinas, que por sua vez, inibem a síntese de glucana da parede de diversos fungos patogênicos (SIDRIM & ROCHA, 2010; CUENCA-ESTRELLA, 2010).

Os poliênicos são lactonas macrocíclicas que apresentam uma porção hidroxilada hidrofílica e uma porção hidrofóbica conjugada por dupla ligação. O mecanismo de ação dessas drogas é através da alteração da permeabilidade das células, pois elas se ligam aos esteróis (ergosterol) na membrana celular, formando poros que permitem o extravasamento dos íons potássio e magnésio e macromoléculas intracelulares (WISPELWEY et al., 2006).

As anfotericinas A e B são antifúngicos produzidos pelo *Streptomyces nodosos,* mas apenas a anfotericina B tem aplicação clínica. Apresenta toxicidade elevada, por isso seu uso é limitado, causa nefrotoxicidade, e, no entanto, continua sendo a droga de primeira escolha para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas causadas por *C. albicans, Cryptococcus neoformans*, além também de ser utilizada para tratar a maioria das infecções endêmicas causadas por *Histoplasma capsulatum*, *Blatomyces dermatitidis* e *Coccidioides immitis* (SILVA, 2006).

A atividade antifúngica dos azólicos se dá pela capacidade que esses apresentam de inibir o citocromo P450 fúngico, através da demetilação da enzima 14-α-demetilase, que participa do processo de síntese de ergosterol. Com o bloqueio da síntese de ergosterol, não acontece a liberação de produtos tóxicos, alteração de permeabilidade da membrana e inibição do desenvolvimento celular fúngico (CUENCA-ESTRELLA, 2014). Os azólicos têm atividade fungistática frente ao gênero *Candida* e o fenômeno da resistência, em especial ao fluconazol, está presente em algumas espécies como *C. glabrata* e *C. krusei* (WHALEY et al., 2016).

Os azólicos dividem-se em dois subgrupos: os imidazólicos – drogas que apresentam elevada toxicidade, o que compromete a sua maior utilização. Os principais antifúngicos deste grupo são: cetoconazol, miconazol e clotrimazol. O outro subgrupo são os triazólicos – devido a seu espectro de atividade e excelente perfil de segurança, os antifúngicos triazólicos tornaram-se os mais utilizados no tratamento de Infecções fúngicas invasivas. Os principais representantes desse grupo são: fluconazol, itraconazol e voriconazol. (ARNOLD et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2011).

As equinocandinas agem diferentemente de outros antifúngicos, estas atuam sobre a β-1,3-glucana-sintetase, enzima necessária para a formação de polímeros de β-1,3-glucana, um dos componentes da parede celular fúngica. Consequentemente, não afetam as células do hospedeiro, sendo a tolerância a estes fármacos maior. A inibição desta enzima reduz a síntese de glucano, causando instabilidade osmótica, lise e morte celular (CUENCA-ESTRELLA, 2010).

3.6.1 Fluconazol

O fluconazol é um fármaco triazólico planejado a partir dos imidazóis de primeira geração. É um dos representantes mais importantes desta classe, devido a sua maior solubilidade em água em comparação aos demais representantes desta classe, e pode ser admistrado por via oral e por via intravenosa (HEERES et al., 2010; PEREIRA, 2007). Ele possui uma boa biodisponibilidade oral, tendo um tempo de meia vida de até 22 horas e, com isso, sua administração é realizada em menor frequência, facilitando a adesão do paciente ao tratamento. Sua principal via de eliminação é a depuração renal devido a sua alta estabilidade metabólica (HEERES et al., 2010).

Fluconazol foi o primeiro antifúngico sistêmico com toxicidade reduzida e com um excelente perfil farmacocinético, com formulações oral e intravenosa, que eram muito bem toleradas pelos pacientes (CUENCA-ESTRELLA, 2010). Este age especificamente inibindo a via da biossíntese do maior componente da membrana celular dos fungos, o ergosterol. Nesse processo inibe a enzima lanosterol 14-alfa-desmetilase no sistema enzimático Citocromo P450 dos fungos, que é codificada pelo gene ERG11. Dessa forma, o lanosterol não poderá ser convertido em ergosterol e consequentemente haverá acúmulos de precuRsores e alterações na membrana fúngica (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006).

Para o fluconazol, a taxa de resistência tem sido observada entre 10% e 25% e os isolados resistentes a este tem apresentado também, uma resistência cruzada com outros agentes

azólicos. E ainda sim apresenta o maior índice terapêutico entre os derivados azólicos, o que o configurando como o azol de escolha no tratamento e profilaxia de muitas infecções fúngicas (SILVA, 2006).

3.7 Resistência a antifúngicos

São descritos na literatura dois tipos de resistência microbiológica, a intrínseca e a adquirida. A resistência intrínseca é uma característica fenotípica de determinada espécie de microrganismo e confere a ele a resistência inata antes da exposição deste ao antifúngico. Já a resistência adquirida ocorre em microrganismos que desenvolveram mutações após a exposição ao antifúngico e posteriormente houve a seleção, sobrevivência e proliferação daqueles mutantes resistentes (ARTHINGTON-SKAGGS et al., 2008).

Na resistência aos medicamentos antifúngicos, existem dois tipos sendo elas a microbiológica e a clínica. A resistência microbiológica se trata da ausência de susceptibilidade de um patógeno fúngico a um agente antifúngico, tendo sido constatada através de testes de susceptibilidade *in vitro* e comparado com outros isolados da mesma espécie. A resistência clínica diz respeito à "persistência de uma infecção fúngica" verificada após realização de tratamento adequado (SANGUINETTI et al., 2015).

Existem diferentes mecanismos bioquímicos que foram descritos e outros que ainda estão em estudo, e que mostram que estes agem isoladamente ou em conjunto, e que tem contribuído para o surgimento do fenótipo de resistência a drogas. O fenômeno da resistência mostra uma dinâmica contínua e versátil, que tem contribuido para o aparecimento de novos aperfeiçoamentos e modificações numa evolução progressiva tão crescente que tem dificultado cada vez mais a eficácia das terapias. Dentre os mecanismos de resistência, estão a redução da captação ou o aumento do efluxo celular por meio de bombas, modificação ou degradação da droga dentro da célula, mudanças na interação da droga com o seu sítio alvo (mutações de ERG11), superexpressão do alvo alterado, desenvolvimento de percursos de desvio, alterações enzimáticas, entre outras (PERLIN et al., 2015; KOŁACZKOWSKA; KOŁACZKOWSKI, 2016).

Resistência aos medicamentos antifúngicos é considerada menos problemática em *Candida* spp. do que em outros agentes patogênicos, mas os recentes aumentos na resistência as equinocandinas e azoles têm levado a falhas clínicas (ALEXANDER et al., 2013; SHIELDS et al., 2012). Sendo está uma das maiores preocupações, justamente por que o número de medicamentos é muito limitado.

Recentemente, a resistência antifúngica de espécies de *Candida* tem sido cada vez mais relatada, exigindo agentes antifúngicos mais potentes (SILVA et al., 2012). Além disso, os efeitos colaterais indesejáveis, tais como hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e neurotoxicidade da maioria dos agentes antibacterianos e antifúngicos são problemas importantes que precisam ser abordados. Portanto, antimicrobianos novos e potentes são essenciais para enfrentar o desafio apresentado pelos microrganismos resistentes a múltiplos fármacos (GUNASEKARA et al., 2017).

A resistência fúngica vem sendo diminuída com a introdução de novas formulações terapêuticas para o tratamento de infecções, entretanto, há uma tendência para a ocorrência de repetição de padrão, uma vez que o excessivo uso de antibioticoterapia favorecerá o desenvolvimento de novos mecanismos de resistência (O'DONNELL; ROBERTSON; RAMAGE, 2015).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta e Identificação do Material Botânico

A coleta de *Persea americana* foi realizada no Horto medicinal da Universidade Regional do Cariri, localizada no municipio de Crato-CE, Nordeste do Brasil, sob as coordenadas geograficas 07°, 14', 19,3'' de latitude Sul e 39°, 24', 53,8" de longitude Oeste de Greenwich. Após a coleta para identificação da mesma foi preparada uma excicata, a qual foi depositada no Herbário Dardano de Andrade Lima sob o número de idenficação 13.258. *Licania rigida* foi coletada no Sitío Cuncas, localizada no municipio de Barro-CE, Nordeste do Brasil, sob as coordenadas geograficas 07°, 05', 26'' de latitude Sul e 38°, 43', 17" de longitude Oeste de Greenwich, após a coleta para identificação da mesma foi preparada uma excicata, a qual foi depositada no Herbário Dardano de Andrade Lima sob o número de idenficação 13.742. Ambas foram coletadas no mês de Abril de 2017, às 9:00 horas da manhã.

4.2 Preparo do Extrato

Para preparação do Extrato Etanólico das Folhas de *Persea americana* Mill. (EEFPa) e do Extrato Etanólico das Folhas de *Licania rigida* Benth (EEFLr) foram utilizadas folhas frescas, as quais foram cortadas para aumentar a superfície de contato. Posteriormente foram adicionadas em Etanol PA, onde foi utilizado 1g de folhas para cada 1mL do solvente, caracterizando maceração com extração a frio (MATOS, 2002). O produto final foi armazenado em um recipiente protegido da ação da luz e o do ar e após 72h foi filtrado e concentrado em rotaevaporador (Q-344B - Quimis - Brasil - 40 rpm, 60 ° C). O extrato obtido foi armazenado para testes sob refrigeração à 6ºC.

4.3 Identificação de compostos por Cromatografia Líquida de Ultraeficiência acoplada à sistema de quadrupolo/tempo de voo (UPLC-QTOF)

A identificação dos compostos fenólicos presentes no Extrato foi realizada em sistema Acquity® UPLC acoplado a um sistema de Quadrupolo/Tempo de Voo (QTOF) (Waters Corporation, Milford, EUA), gentilmente cedido pelo Laboratório de Química e Produtos Naturais, Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza, Ceará). As corridas cromatográficas foram realizadas em coluna Waters Acquity UPLC BEH (150 x 2,1 mm; 1,7 µm), temperatura fixa de 40 ºC, fases móveis água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), gradiente variando de 2% a 95% B (15 min), fluxo de 0,4 mL/min e volume

de injeção de 5 µl. O modo ESI foi adquirido na faixa de 110-1180 Da, temperatura da fonte fixa a 120 ºC, temperatura de dessolvatação de 350 ºC, fluxo do gás dessolvatação de 500 L/h, cone de extração de 0,5 V, voltagem capilar de 2,6 kV. O modo ESI+ foi adquirido na faixa de 110-1180 Da, temperatura da fonte fixa de 120ºC, temperatura de dessolvatação de 350 ºC, fluxo do gás dessolvatação de 500 L/h e voltagem do capilar de 3,2 kV. Leucina encefalina foi utilizada como lock mass. O modo de aquisição foi MSE (espectrometria de massas de alta energia). O instrumento foi controlado pelo software Masslynx® 4.1 (Waters Corporation, Milford, EUA).

4.4 Cepas Utilizadas

As Cepas utilizadas foram obtidas da coleção de Cultura da Universidade Federal de Pernambuco – Universidade Recife Micologia (URM), *American Type Culture Collection* (ATCC) e do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). sendo utilizados 09 isolados: *Candida krusei* URM6352, *Candida krusei* URM4263, *Candida krusei* URM5840, *Candida albicans* URM5900, *Candida krusei* URM5712, *Candida albicans* ATCC90028, *Candida tropicalis* URM5732, *Candida tropicalis* INCQS40042 e *Candida albicans* INCQS40006.

4.5 Preparo do Inóculo para o teste de Sensibilidade

A partir de um cultivo de 24 horas das leveduras testadas, realizado em Sabouraud Dextrose Ágar (SDA), foi preparada uma suspensão de inóculo inicial em 5ml de salina esterilizada (NaCl; salina a 0,85%) e sua densidade foi ajustada de acordo com a escala 0.5 de MacFarland com transmitância de 90% determinada por espectrofotometria, utilizando-se comprimento de onda a 530 nm. Esse procedimento fornece uma concentração padrão de levedura contendo $1x10^6$ a 5×10^6 células por mL, seguida de diluição de 1:100 e posteriormente de uma diluição de 1:20 da suspensão padrão com meio RPMI 1640, resultando em concentração de $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$, as mesmas cresceram a uma temperatura de 37°C.

4.6 Teste de Sensibilidade Antifúngica

O teste de sensibilidade antifúngica *in vitro* foi realizado de acordo com as condições descritas nos documentos em M27-A3 (CLSI, 2008) e M27-S4 (CLSI, 2012). O isolado de *C. albicans* ATCC 90028 foi utilizado como controle. O agente antifúngico utilizado foi o Fluconazol (Pfizer), diluído em RPMI 140 com faixas de concentrações variando de 64 a 0,125

µg/mL. Os Extratos foram diluídos em 1 mL de DMSO e logo depois em água destilada, as concentrações variaram de 2048 a 4 µg/mL. Para os testes de sensibilidade, foram utilizadas placas de microdiluição planas de 96 poços (TPP; Trasadingen, Suíça). O inóculo foi adicionado aos poços com a droga antifúngica e o produto natural, e as placas foram incubadas a 35 °C durante 24 horas para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), a qual foi utilizada no tratamento do biofilme formado pelas leveduras.

4.7 Determinação da Concentração Fungicida Mínima- CFM

Nesse teste foi observado somente a viabilidade fúngica. A partir do teste da CIM, foi adicionado uma haste esterilizada em cada poço da placa de microdiluição, homogeneizada e subcultivada em placa de *Petri* contendo ASD (Sabouraud Dextrose Ágar) e um guia das concentrações testadas. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e a leitura foi realizada observando o crescimento ou supressão das colônias de *Candida* (ERNST, et al. 1999, com modificações).

4.8 Efeito Modulador do Extrato Etanólico das folhas de *Persea americana* e *Licania rígida*

Para verificar a ação conjunta do produto natural aos fármacos comerciais, Fluconazol, utilizando o método proposto por Coutinho et al. (2008), no qual o produto é utilizado em concentração sub-inibitoria (CFM/8). Nos tubos *eppendorf* continham a substância natural + e Caldo Sabouraud Dextrose duplamente concentrado + 150 µL da suspensão fúngica (correspondente a 10% da solução). Foram preparados controles de crescimento e de diluição. A placa foi preenchida no sentido numérico adicionando-se 100 µL desta solução em cada poço. Em seguida, feita a microdiluição seriada com 100 µL do Fluconazol. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. A leitura foi realizada por meio do aparelho espectrofotometria de ELISA (Termoplate®) com comprimento de onda de 630 nm. Se houve ação positiva dos EEFPa e EEFLr em conjunto com o Fluconazol o efeito é dito sinérgico, em caso contrário é dito antagônico.

4.9 Avaliação do efeito do EEFPa e do EEFLr sobre a virulência fúngica

Para verificar a ação do EEFPa e do EEFLr sobre um dos fatores de virulência fúngica, a formação de hifas e pseudo-hifas, foram montadas câmaras úmidas estéreis. Dentro de cada câmara úmida, sobre uma lâmina de microscopia (estéril) foram vertidos 3 mL de meio PDA (Potato Dextrose Ágar), empobrecido, contendo o extrato em concentração definida a partir da

CFM (CFM /2 e CFM/4). Das placas de *Petri* previamente inoculadas, foram retirados alçadas do inóculo e feito duas estrias paralelas, sobre o meio já solidificado, sendo em seguida, sobre as quais depositada uma lamínula estéril. As câmaras foram incubadas e após 24 h (37 °C) foram visualizadas em microscópio óptico (AXIO IMAGER M2-3525001980 – ZEISS - Alemanha) utilizando objetiva de 20 X. Foi verificado a emissão ou inibição de filamentos. Realizou-se a captura de imagens. Controles de crescimento e do antifúngico foram realizados. Posteriormente as fotos foram analisadas realizando as medições de hifas e utilizando o Software para identificar a porcentagem de inibição das substancias (SIDRIM; ROCHA, 2010, com modificações; BEZERRA et al., 2018).

4.10 Mensuração da Extensão das Estruturas Filamentosas

A partir do software Zen que atua juntamente com o microscópio óptico (AXIO IMAGER M2-3525001980- ZEISS- Alemanha) foi possível mensurar as extensões atingidas pelas hifas e pseudohifas e os valores de redução após ação dos EEFPa, EEFLr e do Fluconazol. Foram retiradas dez fotos de cada lâmina, de acordo com as concentrações, de cada foto foram escolhidas aleatoriamente dez hifas/pseudohifas a serem medidas, e foram tiradas também fotos das estrias para medir a borda inteira e dela diminuir de onde não houve formação de hifas/pseudohifas, após isso foi realizado a média aritmética do comprimento de cada lâmina e no final as médias foram compiladas (BEZERRA et al., 2018, com modificações).

4.11 Preparo dos Discos de Resina Acrílica

Os discos foram preparados com Resina Acrílica autopolimerisável associada ao Líquido Acrílico autopolimerisável (VIPIFLASH). Estes foram preparados em formas que apresentavam 5x1mm de diâmetro, após o preparo, os mesmos foram esterilizados em autoclave.

4.12 Preparo das Soluções para o teste de Biofilme

A solução matricial do extrato foi preparada através da diluição de 0,05g em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO - Sigma-Aldrich). Os extratos foram preparados na concentração de 2048µg/mL. O fluconazol (Pfizer) foi utilizado como droga antifúngica de referência na concentração de 64µg/mL.

4.13 Avaliação da capacidade de formação de Biofilme em Discos de Resina Acrílica

As leveduras foram cultivadas em Yeast Extract Peptone (YPD) a 37°C overnight, em seguida foram suspensas em meio RPMI tamponado com HEPES e ajustada para concentração de 106 células/ mL. Posteriormente 100 µL foram adicionados em poços das placas de poliestireno de 96 poços contendo os discos de resina acrílica, as quais foram mantidas a 37°C por 2h a 75 rpm (fase de adesão). Em seguida, os poços contendo os discos foram lavados três vezes com tampão fosfato (PBS) para remover células não aderentes. E então foram durante 48h a 37°C para posterior avaliação.

A quantificação dos biofilmes foi realizada com o ensaio de redução de sal tetrazólico, onde 20µL, na proporção de 5µL para 1mL de tampão PBS, esterilizado por filtração de membrana (Millipore, poros 0,22µL) foi adicionado a cada poço da placa de microtitulação, inclusive nos controles, as placas foram incubadas na ausência de luz a temperatura de 37°C por 18h. Posteriormente, o corante foi aspirado e então adicionado 200µL de isopropanol (Fremosier et el., 1999; Berridge; Herst; Tan; 2005). As placas foram mantidas em repouso por 15 min e em seguida foram transferidos 100 µL do conteúdo de cada poço para uma nova placa de microtitulação a fim de proceder a leitura em leitor de microplacas com 570nm de comprimento de onda.

4.14 Tratamento do Biofilme

Os biofilmes foram formados em disco de resina como descrito anteriormente. Após o período de 48h, os discos revestidos com biofilme foram transferidos para uma nova placa e os poços da mesma foram preenchidos com 180µL da solução contendo Fluconazol e também do EEFLr e do EEFPa. O extrato e a droga padrão foram diluídos em RPMI 1640. 6 horas após a adição do Fluconazol e do extrato foi realizada a quantificação dos biofilmes com o ensaio de redução de sal tetrazólico, onde 20µL, na proporção de 5µL para 1mL de tampão PBS, esterilizado por filtração de membrana (Millipore, poros 0,22µL) foi adicionado a cada poço da placa de microtitulação, inclusive nos controles, as placas foram incubadas na ausência de luz a temperatura de 37°C por 18h. Posteriormente, o corante foi aspirado e então adicionado 200µL de isopropanol (Fremosier et el., 1999; Berridge; Herst; Tan; 2005). As placas foram mantidas em repouso por 15 min e em seguida foram transferidos 100 µL do conteúdo de cada poço para uma nova placa de microtitulação a fim de proceder a leitura em leitor de microplacas com 570nm de comprimento de onda.

4.15 Análise Estatística

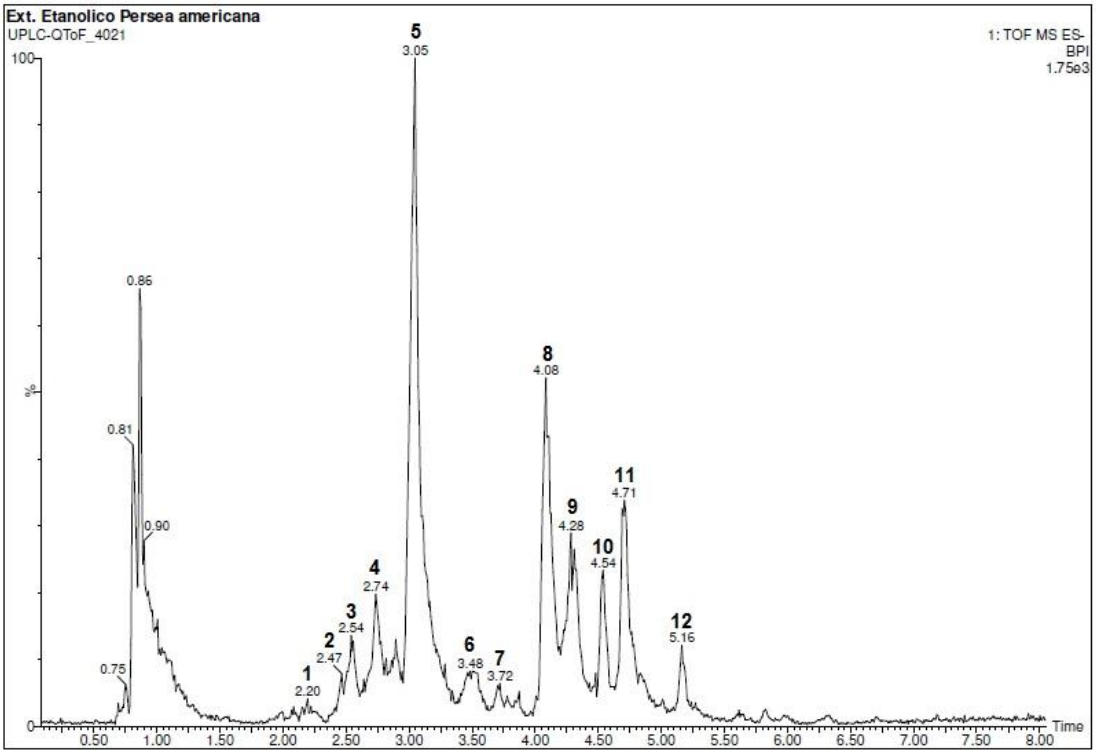
Os dados obtidos foram verificados quanto à sua distribuição normal e depois analisados por ANOVA de duas vias ($P < 0.05$; $*P < 0.1$; $****P < 0.0001$), comparando os valores para cada concentração do extrato, ponto a ponto, com o teste post hoc de Bonferroni. Os valores de IC_{50} foram obtidos por regressão não linear com interpolação de incógnitas de curvas padrão obtidas a partir dos valores do crescimento fúngico em função da concentração do extrato e expressos em μg/mL. Para a análise estatística, foi utilizado o software Graphpad Prism, v. 5.0. O tratamento dos biofilmes foi realizados em triplicata para cada cepa. A análise estatística foi calculada utilizando o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA). Os dados são expressos como médias geométricas. Para a análise, o teste de comparações múltiplas de Tukey foi realizado para todas as médias obtidas ao nível de 5% de significância.

5 RESULTADOS

5.1 Identificação de compostos por Cromatografia Líquida de Ultraeficiência acoplada à sistema de quadrupolo/tempo de voo (UPLC-QTOF)

A caracterização dos componentes presentes no EEFPa foi realizada através do método de UPLC- ESI- QTOF- MS no modo iônico negativo. Na figura 3 observa-se o Cromatograma da espectrometria de massa de alta resolução (UPLC-MS) do Extrato Etanólico das Folhas de *Persea americana*. A identificação baseada na massa de íons moleculares, tempo de retenção, padrão de fragmentação e nos dados da literatura resultou em 12 compostos mostrados na tabela 1 de acordo com sua ordem de eluição, fórmula molecular, erro e fragmentos principais, sendo possível a identificação de 10 constituintes. Os compostos identificados derivam de compostos fenólicos, como ácidos fenólicos (Ácido Protocatecuíco e o ácido Caffeoilquinico), polifenóis (hydroxitirosola), taninos condensados (catequina e procianidina) e flavonóides (rutina-quercetina e luteolina).

Figura 3 -Cromatografia líquida de alta performance com espectrometria de massa de alta resolução (UPLC-MS) do EEFPa em modo iônico negativo.



Fonte: A autora (2020).

Table 1. Analysis of UPLC-ESI-QTOF-MS- Identification of Chemical Constituents of the *Persea americana* Mill Leaves Ethanol Extract.

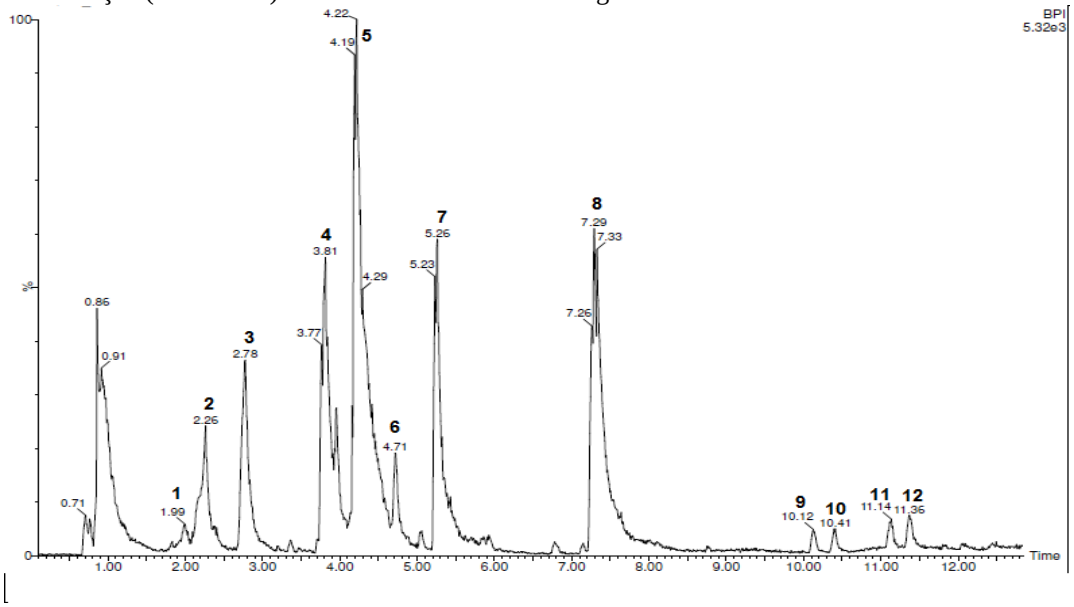
Peak no.	**Rt min**	**$[M-H]^-$ Observed**	**$[M-H]^-$ Calculated**	**Product Ions (MS/MS)**	**Empirical Formula**	**Ppm (error)**	**Putative Name**	**References**
1	2.20	315.0728	315.0716	108.0226, 152.0058	$C_{13}H_{16}O_9$	3.8	Protocatechuic acid-4-glucoside (Protocatecúco-4-glucoside acid)	Gomez-Caravaca et al., 2015
2	2.47	153.0556	153.0552	89.0249, 119.0344, 123.0453	$C_8H_9O_3$	2.6	Hydroxytyrosola	Dierkes et al., 2012
3	2.54	353.0889	353.0878	191.0548	$C_{16}H_{18}O_9$	4.0	Caffeoylquinic acid	Gomez-Caravaca et al., 2015
4	2.74	577.1368	577.1351	289.0682	$C_{30}H_{26}O_{12}$	2.3	Procyanidin dimer I type B	Gomez-Caravaca et al., 2015
5	3.05	289.0727	289.0712	123.0477	$C_{15}H_{14}O_6$	2.9	Catechin	Gomez-Caravaca et al., 2015
6	3.48	865.1992	865.1992	577.1282, 289.0729	$C_{45}H_{38}O_{18}$	1.4	Procyanidin trimer II	Gomez-Caravaca et al., 2015

7	3.72	577.1368	577.1351	289.0682	$C_{30}H_{26}O_{12}$	2.3	Procyanidin dimer I type B	Gomez-Caravaca et al., 2015
8	4.08	609.1435	609.1456	301.0312	$C_{27}H_{30}O_{16}$	3.4	Routine/Quercetin 3-O-rutinoside	Gomez-Caravaca et al., 2015
9	4.28	463.0879	463.0877	380.9849, 301.0335	$C_{21}H_{20}O_{12}$	0.4	(Não identificado)	-
10	4.54	433.0778	433.0771	435.0803	$C_{20}H_{18}O_{11}$	1.6	Quercetin pentosideo	Hurtado-Fernández et al., 2011
11	4.71	285.0389	285.0399	364.9987, 285.0392	$C_{15}H_{9}O_{6}$	4.6	Luteolin	Dierkes et al., 2012
12	5.16	431.0983	431.0978	285.0362, 284.0295, 255.0357,	$C_{21}H_{19}O_{10}$	1.2	(Não identificado)	-

Fonte: A autora (2020).

A caracterização dos componentes presentes no Extrato Etanólico das Folhas de *Licania rigida* (EEFLr) foi realizada através do método de UPLC- ESI- QTOF- MS no modo iônico negativo. Na figura 4 observa-se o Cromatograma da espectrometria de massa de alta resolução (UPLC-MS) do Extrato Etanólico das Folhas de *Licania rigida*, onde são observados os picos cromatográficos dos compostos presentes no extrato . A identificação baseada na massa de íons moleculares, tempo de retenção, padrão de fragmentação e nos dados da literatura resultou em 12 compostos mostrados na tabela 2 de acordo com sua ordem de eluição, fórmula molecular, erro e fragmentos principais, sendo possível a identificação de 6 constituintes. Os compostos identificados derivam de compostos fenólicos como os flavonoides Dimero (epi)gallocatequina, epigalocatequina e Gallocatequina, Miricetina-O-hexoside, Miricitrina, Quercetina-O-rhamnoside.

Figura 4 -Cromatografia líquida de alta performance com espectrometria de massa de alta resolução (UPLC-MS)do EEFLr em modo iônico negativo.



Fonte: A autora (2020).

Table 2. Analysis of UPLC-ESI-QTOF-MS- Identification of Chemical Constituents of the *Licania rigida* Leaves Ethanol Extract.

Peak no.	**Rt min**	**$[M-H]^-$ Observed**	**$[M-H]^-$ Calculated**	**Product Ions (MS/MS)**	**Empirical Formula**	**Ppm (error)**	**Putative Name**	**Referências**
1	1.93	609.1260	609.1244	305.0717, 441.0822, 423.0754	$C_{30}H_{25}O_{14}$	2.6	(epi)gallocatechin Dimer (Epigalocatequina)	Bárbara et al., 2016
2	2.24	305.0655	305.0661	137.0216, 167.0338, 179.0385	$C_{15}H_{14}O_7$	2.0	(-)-epigalocatequina	Bárbara et al., 2016
3	2.76	305.0602	305.0661	137.0216, 167.0338, 179.0385	$C_{15}H_{14}O_7$	19.3	Gallocatechin	Bárbara et al., 2016
4	3.73	479.0828	479.0826	271.0225, 316.0199	$C_{21}H_{19}O_{13}$	0.4	Myricetin-O-hexoside	Lingguang et al., 2017
5	4.19	463.0879	463.0877	316.0143	$C_{21}H_{19}O_{12}$	0.4	Myricitrin	Lingguang et al., 2017
6	4.71	447.0913	447.0927	255.0283, 271.0165	$C_{21}H_{19}O_{11}$	3.1	Quercetin-O-rhamnoside	Lingguang et al., 2017
7	5.26	351.0147	351.0141	151.0035, 203.9725, 271.0602	$C_{18}H_7O_8$	1.7	Não identificado	-
8	7.29	363.0135	363.0141	267.0294, 268.0337, 283.0612, 347.9891	$C_{19}H_7O_8$	1.7	Não identificado	-

9	10.13	397.1346	397.1346	125.0241, 183.0080, 277.2179, 311.1738	$C_{15}H_{25}O_{12}$	3.5	Não identificado	-
10	10.41	397.1363	397.1346	183.0066, 235.0800, 277.2123, 325.1740	$C_{15}H_{25}O_{12}$	4.3	Não identificado	-
11	11.14	277.2164	277.2168	183.0114, 184.0016, 253.1086	$C_{18}H_{29}O_2$	1.4	Não identificado	-
12	11.36	277.2170	277.2168	183.0114, 184.0264, 253.1031	$C_{18}H_{29}O_2$	0.7	Não identificado	-

Fonte: A autora (2020).

5.2 Teste de Sensibilidade Antifúngica

A avaliação da atividade antifúngica do EEFPa frente as cepas utilizadas, foi determinada através da CIM, a qual mostrou resultados promissores para as cepas *C. krusei* URM4263, *C. krusei* URM6352, *C. krusei* URM5840, *C. tropicalis* URM5732 e *C. tropicalis* URM5712 com CIMs de 64 µg/mL, 256 µg/mL, 256 µg/mL 512 µg/mL e 512 µg/mL respectivamente. Nos demais isolados as CIMs foram iguais ou superiores a 1024 µg/mL. O fluconazol foi usado como droga controle, e as concentrações do mesmo variaram de 64 a 1µg/mL (Tabela 3).

Tabela 3. mostra a concentração inibitória mínima (CIM) (µg / mL) de EEFPa e fluconazol antifúngico em relação aos isolados utilizados neste estudo.

Cepas	EEFPa	Fluconazol
URM5900	1024 µg/mL	16 µg/mL
URM5712	512 µg/mL	64 µg/mL
URM5732	512 µg/mL	64 µg/mL
ATCC90028	1024 µg/mL	1 µg/mL
INCQS40042	1024 µg/mL	64 µg/mL
INCQS40006	1024 µg/mL	64 µg/mL
URM4263	256 µg/mL	64 µg/mL
URM6352	256 µg/mL	64 µg/mL
URM584O	64 µg/mL	64 µg/mL

Fonte: A autora (2020).

A avaliação da atividade antifúngica do EEFLr frente as cepas utilizadas foi determinada através da CIM, a qual mostrou resultados significativos com as espécies *C. albicans* URM5900, *C. krusei* URM5712, *C. albicans* ATCC90028, *C. krusei* URM4263, *C. krusei* URM6352 e *C. krusei* URM5840 apresentaram respectivamente CIM's de 512 µg/mL, 256 µg/mL, 256 µg/mL, 32 µg/mL, 64 µg/mL e 32 µg/mL. Os demais isolados *C. tropicalis* URM5732, *C. albicans* INCQS40006 e *C. krusei* INCQS40042 mostraram CIM's ≥1024 µg/mL. O fluconazol foi usado como droga controle, e as concentrações do mesmo variaram de 64 a 1µg/mL (Tabela 4).

Table 4. A Tabela 4. mostra a concentração inibitória mínima (CIM) (µg / mL) de EEFLr e fluconazol antifúngico em relação aos isolados utilizados neste estudo.

Cepas	EEFLr	Fluconazol
URM5900	512 µg/mL	16 µg/mL

URM5712	256 µg/mL	64 µg/mL
URM5732	≥1024 µg/mL	64 µg/mL
ATCC90028	256 µg/mL	1 µg/mL
INCQS40042	≥1024 µg/mL	64 µg/mL
INCQS40006	≥1024 µg/mL	64 µg/mL
URM4263	32 µg/mL	64 µg/mL
URM6352	64 µg/mL	64 µg/mL
URM584O	32 µg/mL	32 µg/mL

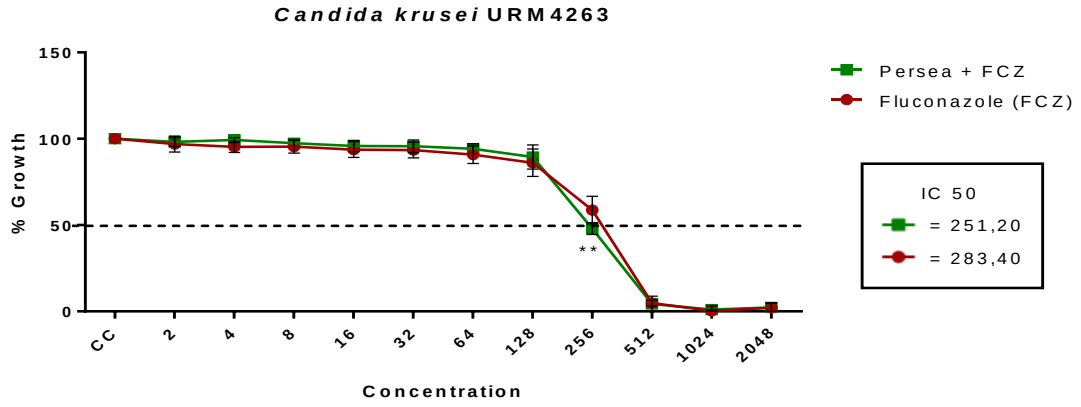
Fonte: A autora (2020).

5.3 Determinação da Concentração Fungicida Mínima- CFM, Efeito modulador e avaliação do efeito do EEFPa e do EEFLr sobre a virulência fúngica.

Na determinação da Concentração Fungicida Minima do EEFPa frente as cepas em estudo, foi observada uma CFM de 512 µg/mL para *C. krusei* URM4263 e 32 µg/mL para os isolados *C. krusei* URM5840 e *C. krusei* URM6352. Com o EEFLr o isolado *C. albicans* URM5900 mostrou CFM de 512 µg/mL, para *C. krusei* URM5712 igual a 128 µg/mL, *C. krusei* URM4263, *C. krusei* URM5840 e com o isolado *C. krusei* URM6352 a CFM foi de 32 µg/mL. Com o Fluconazol o isolado *C. albicans* URM5900 foi observada CFM de 16 µg/mL.

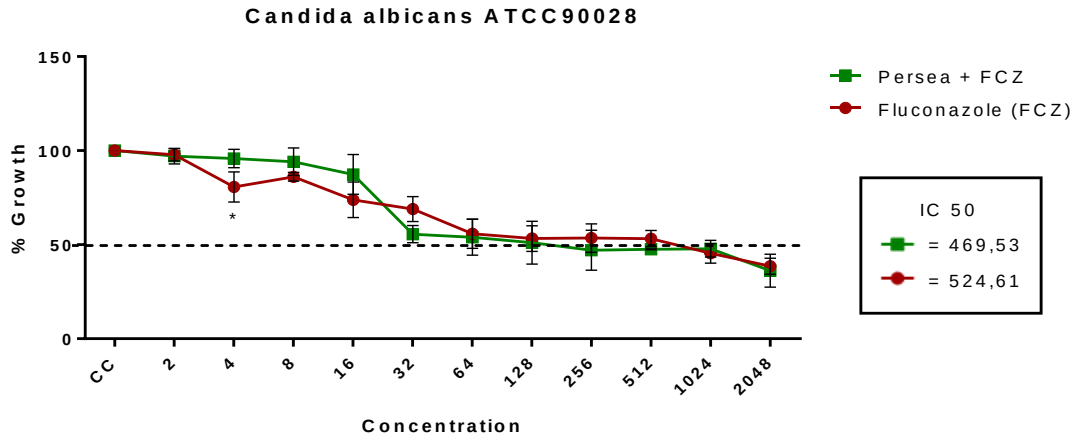
A verificação do potencial modulatório mostrou que o EEFPa associado ao Fluconazol, concentrações do fluconazol variaram de 2 a 2048µg/mL, mostrou-se indeferente, pois o resultado para o fluconazol foi o mesmo, tanto sozinho como em associação com o extrato. A IC_{50} do extrato mostrou-se menor em relação a do Fluconazol com ambos os microrganismos, sendo a IC_{50} do EEFPa para o microrganismo *C. krusei* URM4263 de 251,20 e para o Fluconazol de 283,40 (Figura 5), e com a cepa *C. albicans* ATCC90028 para o extrato foi de 496,53 e para o Fluconazol de 524,61 (Figura 6). Com o EEFLr associado ao Fluconazol foi observado efeito modulador, sinérgico para a cepa *C. krusei* URM5712, com a cepa *C. albicans* ATCC90028 não foi observado sinergismo, mas sim antogonismo, pois o Fluconazol mostrou-se melhor sozinho. Quanto a IC_{50} do EEFLr para *C. krusei* URM5712 foi de 162,25 e para o Fluconazol de 1209,58 (Figura 7), e para *C. albicans* ATCC90028 para o extrato foi de 911,16 e para o Fluconazol de 748,56 (Figura 8).

Figura 5 -Efeito Antifúngico do Extrato Etanólico das Folhas de *Persea americana* comparado com antifúngico padrão. FCZ: Fluconazole; *Candida krusei* URM4263; IC50 (µg/mL): Concentração Inibitória de 50% da cepa fúngica. p < 0,05 = *; p < 0,0001 = ****, quando comparado ao controle de FCZ.



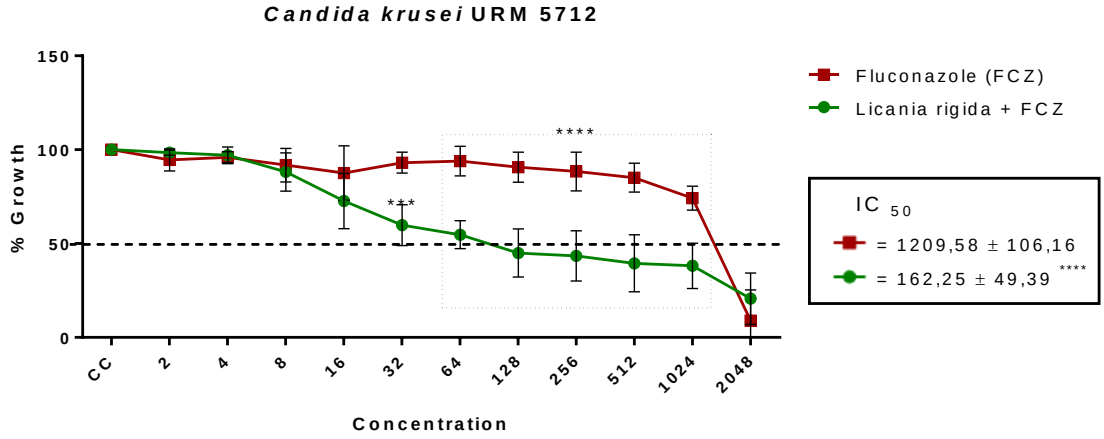
Fonte: A autora (2020).

Figura 6 -Efeito Antifúngico do Extrato Etanólico das Folhas de *Persea americana* comparado com antifúngico padrão. FCZ: Fluconazole; *Candida albicans* ATCC90028; IC50 (µg/mL): Concentração Inibitória de 50% da cepa fúngica. p < 0,05 = *; p < 0,0001 = ****, quando comparado com o controle de FCZ.



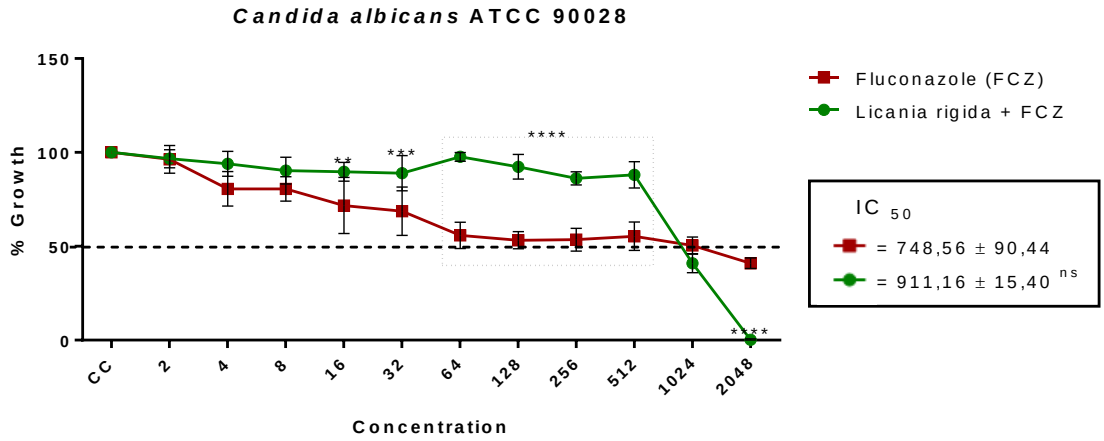
Fonte: A autora (2020).

Figura 7 -Efeito Antifúngico do Extrato Etanólico das Folhas de *Licania rigida* comparado com antifúngico padrão. FCZ: Fluconazole; *Candida krusei* URM 5712; IC50 (µg/mL): Concentração Inibitória de 50% da cepa fúngica. p < 0,05 = *; p < 0,0001 = ****, quando comparado com o controle de FCZ.



Fonte: A autora (2020).

Figura 8 -Efeito Antifúngico do Extrato Etanólico das Folhas de *Licania rigida* comparado com antifúngico padrão. FCZ: Fluconazole; *Candida albicans* ATCC90028; IC50 (µg/mL): Concentração Inibitória de 50% da cepa fúngica. p < 0,05 = *; p < 0,0001 = ****, quando comparado com o controle de FCZ.

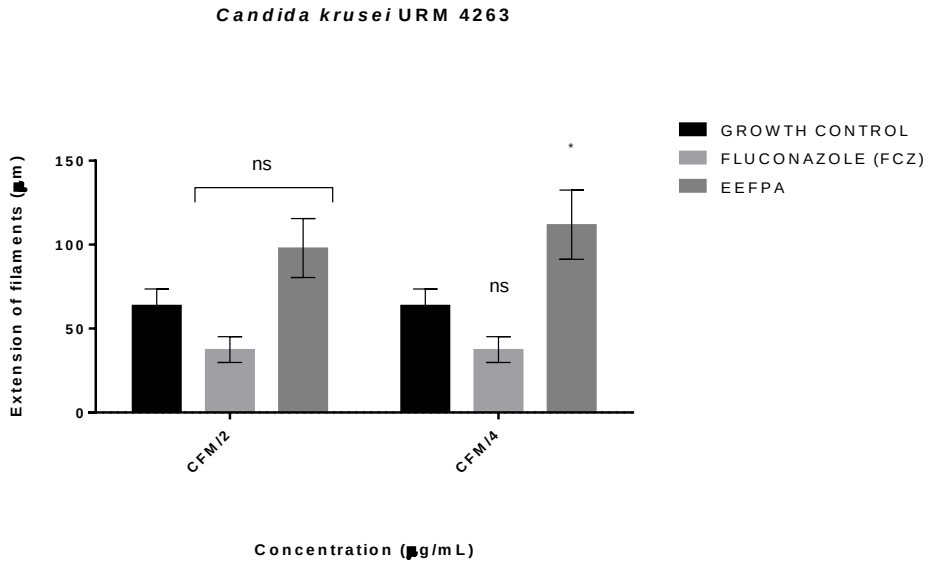


Fonte: A autora (2020).

Para verificação das alterações morfológicas de *Candida*, na CFM/2 (concentração de 256 µg/mL) de *C. krusei* URM4263 o EEFPa não demonstrou resultados significativos do ponto de vista estatístico quando comparada ao controle de crescimento, uma vez que o mesmo se mostrou maior que o próprio controle de crescimento. O fluconazol com CFM/2 de 32 µg/mL, mostrou resultados relevantes, pois este conseguiu reduzir o processo filamentoso dessa cepa (figura 9). Quanto a *C. albicans* ATCC90028, houve redução significativa estatísticamente na CFM/2, na concentração de 512 µg/mL, do EEFPa. Quando comparado ao controle de crescimento, essa redução também foi observada no Fluconazol, CFM/2 com concentração de 32 µg/mL , onde o mesmo inibiu a filamentação dessa cepa (figura 10).

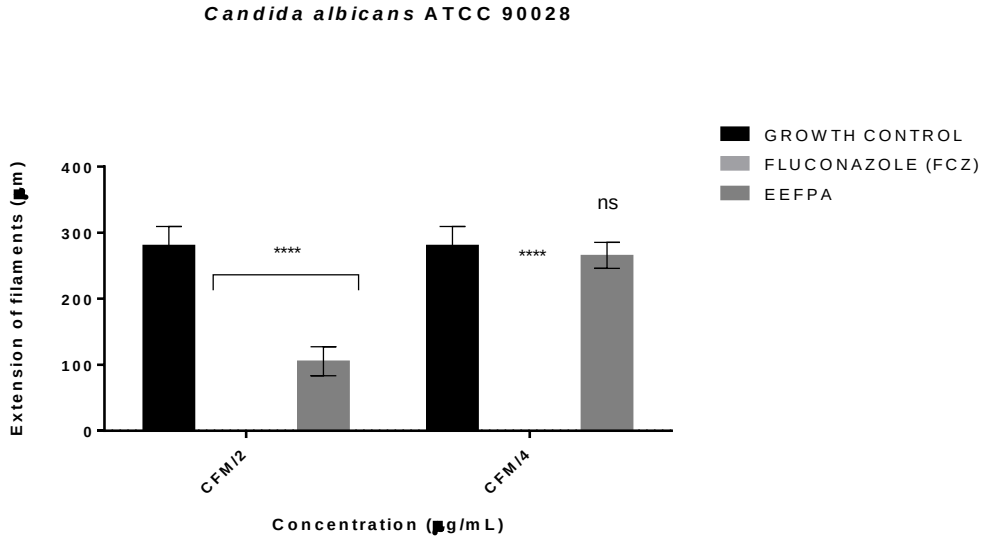
Na CFM/4 a concentração do EEFPa foi de 128 µg/mL, no resultado observado o produto não conseguiu se mostrar eficiente na redução ou inibição da filamentação de *C. krusei* URM4263, a mesma mostrou-se maior quando comparado ao controle (figura 9). Com o Fluconazol, na concentração de 32 µg/mL, houve redução significativa da filamentação. Em relação a *C. albicans* ATCC90028 na CFM/4 (256 µg/mL), não houve resultado relevante do EEFPa, quando comparado ao controle. Observou-se com o fluconazol, com concentração de 32 µg/mL, o mesmo resultado da CFM/2, visto que o este conseguiu inibir a filamentação da mesma (figura 10).

Figura 9 -Efeito inibidor de transição morfológica de *Candida krusei* URM4263 pelo Extrato Etanólico das Folhas de *P. americana* (EEFPa).



Fonte: A autora (2020).

Figura 10 -Efeito inibidor de transição morfológica de *Candida albicans* ATCC90028 pelo Extrato Etanólico das Folhas de *P. americana* (EEFPa).

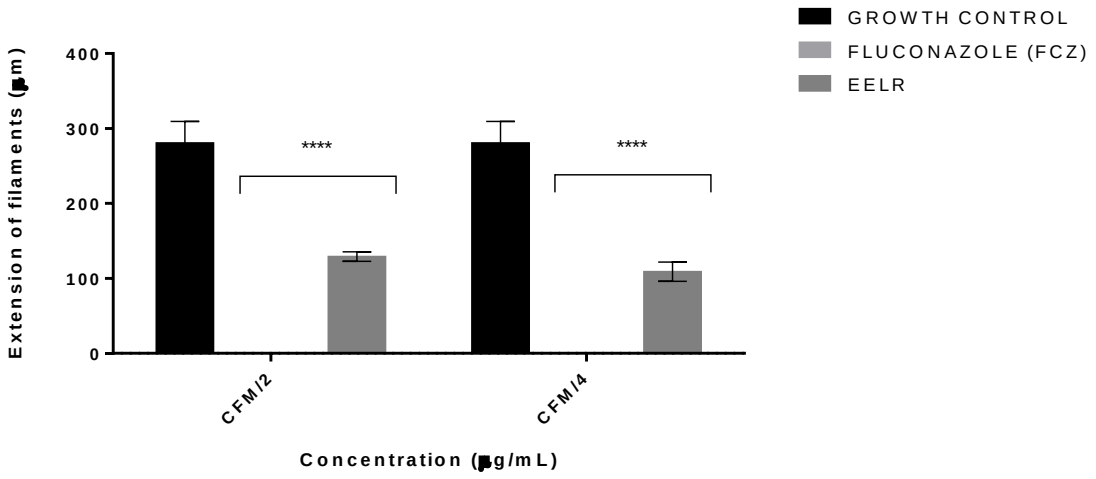


Fonte: A autora (2020).

Na CFM/2, concentração de 32 µg/mL, com o isolado *C. albicans* ATCC90028 (figura 11) houve redução da filamentação em relação ao controle. Com o isolado *C. albicans* URM5900 o EEFLr foi capaz de reduzir a filamentação em relação ao controle, mas não em relação ao fluconazol (figura 12). Em *C. krusei* URM6352 também foi possivel observar essa

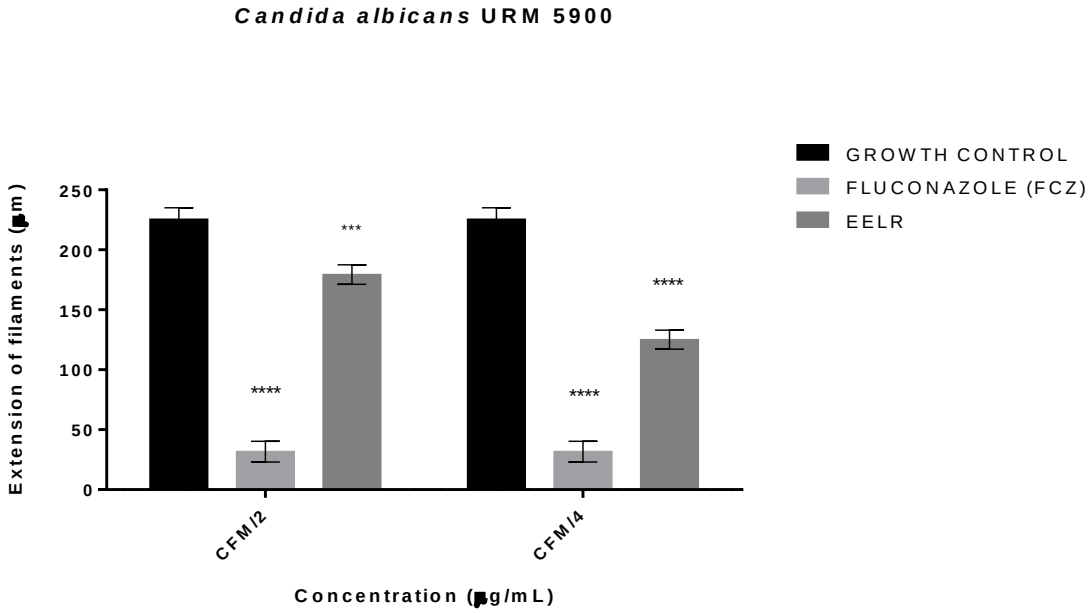
redução, principalmente em relação ao fluconazol (figura 13). Na CFM/4 o resultado observado mostra que o EEFLr foi capaz de inibir a filamentação em *C. albicans* ATCC90028 (figura 11), essa inibição foi mais presente com o fluconazol. Redução significativa foi observada em *C. albicans* URM5900 tanto com o EEFLr como com o Fluconazol (figura 12), e com *C. krusei* URM6352 houve redução somente com o produto (figura 13).

Figura 11 -Efeito inibidor de transição morfológica de *Candida albicans* ATCC90028 pelo Extrato Etanólico das Folhas de *L. rigida* (EEFLr).



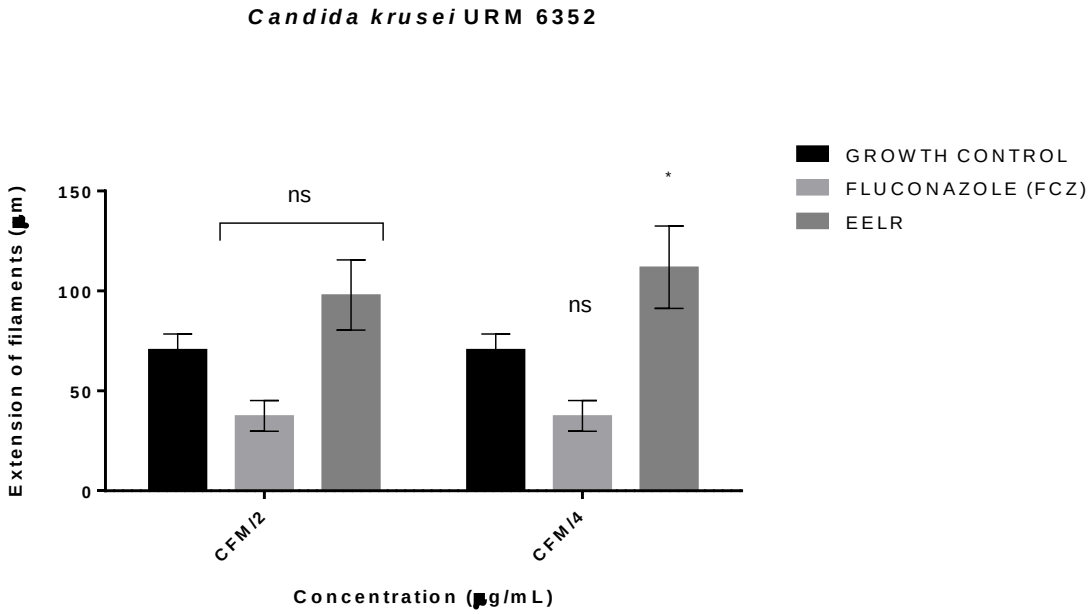
Fonte: A autora (2020).

Figura 12 -Efeito inibidor de transição morfológica de *Candida albicans* URM5900 pelo Extrato Etanólico das Folhas de *L. rigida* (EEFLr).



Fonte: A autora (2020).

Figura 13 -Efeito inibidor de transição morfológica de *Candida krusei* URM6352 pelo Extrato Etanólico das Folhas de *L. rigida* (EEFLr).

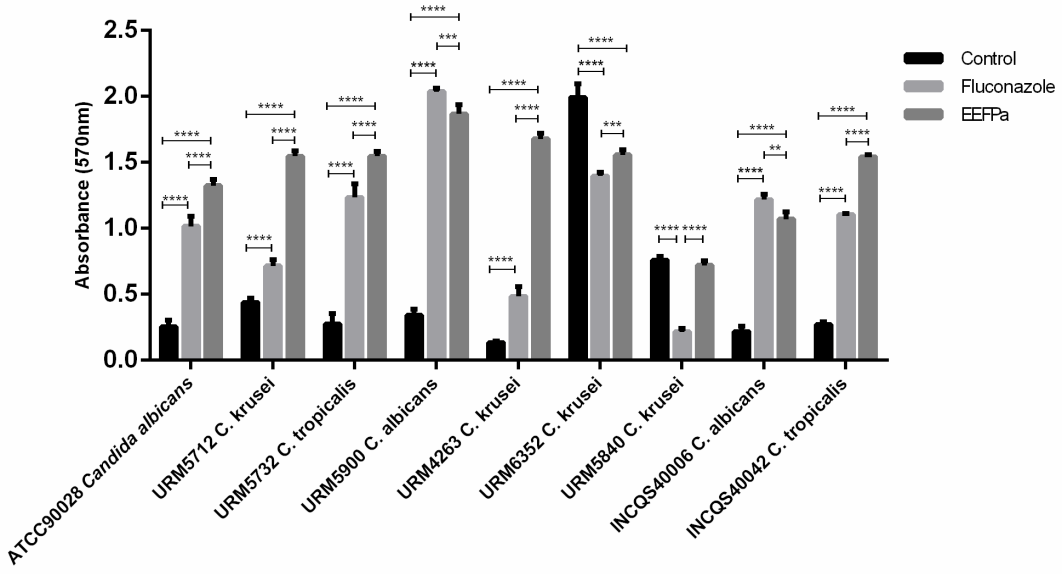


Fonte: A autora (2020).

5.4 Avaliação da capacidade de formação de Biofilme em Discos de Resina Acrílica.

Na indução do biofilme, todos os isolados de leveduras mostraram-se capazes de formar biofilmes em 48 horas com diferentes intensidades. No tratamento do biofilme dos isolados *Candida tropicalis* URM 5712, *Candida tropicalis* INCQS 40042, *Candida tropicalis* URM 5712, *Candida krusei* URM 4263, *Candida krusei* URM 5840 e *Candida albicans* ATCC 90028 com o antifúngico Fluconazol houve redução do biofilme quando comparado ao tratamento com o EEFPa, com os isolados *Candida albicans* 40006 e *Candida albicans* URM 5900 houve redução no tratamento com extrato, quando comparado ao tratamento com o fluconazol. Com a cepa *Candida krusei* URM 6352 houve redução tanto com o tratamento com o extrato como com o fluconazol, quando comparados ao controle (figura 14).

Figura 14 -Atividade oxidativa do tratamento de biofilme com Fluconazol (64µg/mL) e Extrato Etanólico das Folhas de *Persea americana* (EEFPa) (2048µg/mL) formado por leveduras clínicas do gênero *Candida*. Os dados representam a média e desvio padrão da absorbância do MTT durante a produção e tratamento dos biofilmes. Para a análise, o teste de comparações múltiplas de Tukey foi realizado para todas as médias obtidas ao nível de 5% de significância. Os símbolos "**", "***", "****" indicam diferenças significativas entre os tratamentos e controle com ($p \leq 0{,}001$), ($p \leq 0{,}0003$) e ($p \leq 0{,}0001$), respectivamente.

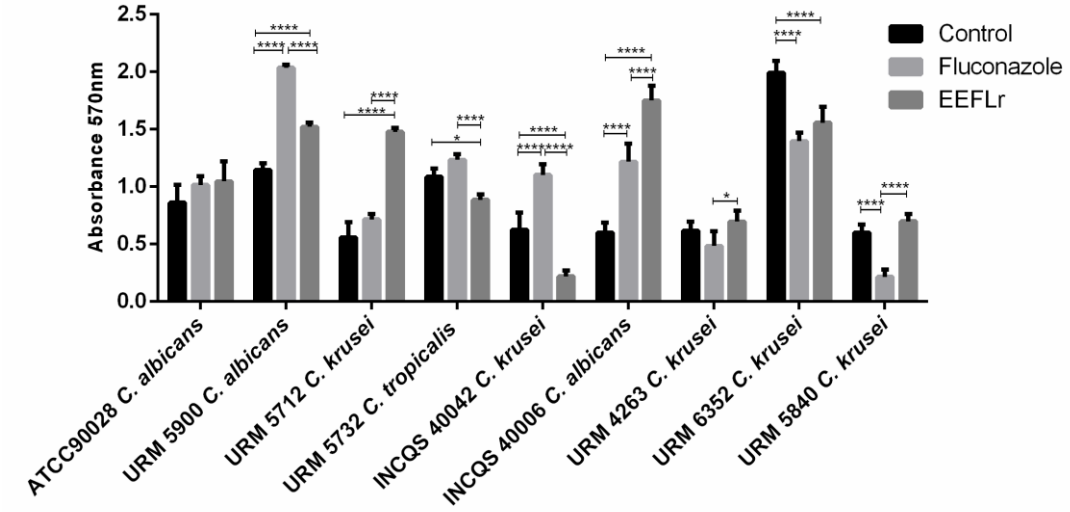


Fonte: A autora (2020).

No tratamento dos biofilmes, os isolados *C. tropicalis* URM5732 e *C. krusei* INCQS40042 mostraram redução da formação de biofilme quando comparadas tanto ao controle, quanto ao tratamento com fluconazol. Com isolado *C. albicans* URM5900 o tratamento se mostrou mais eficaz quando tratado com o EEFLr. O isolado *C. albicans* ATCC90028 não apresentou diferença significativa entre os tratamentos com o extrato

e o fluconazol. Em *C. krusei* URM6352 foi observado redução do biofilme com ambos os tratamentos. Com relação aos demais microrganismos, *C. krusei* URM5712, *C. albicans* INCQS40006, *C. krusei* URM4263 e *C. krusei* URM5840 foi observado que no tratamento com o fluconazol houve uma maior redução dos biofilmes quando comparado ao extrato (figura 15).

Figura 15 -Atividade oxidativa do tratamento de biofilme com fluconazol (64 µg / mL) e extrato etanólico de folhas de *Licania rigida* (EEFLr) (2048 µg / mL) formados por leveduras clínicas de *Candida*. Os dados representam a média e o desvio padrão da absorbância do MTT durante a produção e o tratamento de biofilme. Para a análise, foi realizado o teste de comparações múltiplas de Tukey para todas as médias obtidas no nível de significância de 5%. Os símbolos "*" e "****" indicam diferenças significativas entre tratamentos e controle com ($p \leq 0,05$) e ($p \leq 0,0001$), respectivamente.



Fonte: A autora (2020).

6 DISCUSSÃO

Em trabalho realizado por Vita Di Stefano et al. (2017), os mesmos analisaram a composição química do fruto de seis cultivares de abacate através de UHPLC, e também identificaram a presença de ácido protocatecuico. Trabalho semelhante foi realizado por Agnieszka et al. (2012), em que foi analisada a casca e a semente de dois cultivares através de HPLC-ESI-MS e conseguiram identificar os dímeros de procianidina do tipo A e tipo B. Rodriguez-Carpena et al. (2011), relataram a presença de catequinas, procianidinas e flavonóis tanto na casca como na semente do fruto de abacate. Em nosso estudo, identificamos os mesmos compostos descritos nos trabalhos anteriores, no entanto as partes analisadas por esse estudo foram as folhas e não as cascas, frutos e sementes do abacateiro.

Os constituintes presentes no EEFLr como o Dimero de (epi)gallocatequina, epigalocatequina e Gallocatequina, Miricetina-O-hexoside, Miricitrina, Quercetina-O-rhamnoside foram encontrados por meio de outras técnicas em estudos anteriores, como no trabalho realizado por Parra et al. (2016), onde foram encontrados através de análise de HPLC-DAD do extrato etanólico de *Licania rigida* os compostos epicatequina e quercitrina. Braca et al. (2002), realizaram essa análise com diferentes espécies do gênero *Licania*, *L. apetalada*, *L. densiflora*, *L. heteromorfa*, *L. pittieri*, *L. pyrifolia* e *L. carii* mostraram que eles tinham a presença de alguns derivados flavonóides, como quercetina e miricetina. O estudo feito por Soares et al. (2019), com extrato hidroalcoólico de *Licania rigida* foi encontrado a epicatechin. Esses resultados corroboram com os encontrados em nosso estudo.

A atividade antifúngica observada no teste de sensibilidade deve-se provavelmente à capacidade dos flavonóides em formar complexos com proteínas solúveis presentes nas paredes das células fúngicas. A natureza lipofílica desses também é capaz de romper as membranas dos fungos (ARIF et al., 2011; SALAS et al., 2011). Acredita-se que essa capacidade de romper e penetrar a membrana fúngica tenha contribuído para efetividade dos extratos em inibir o crescimento fúngico. Compostos fenólicos como catequina, luteolina e quercetina apresentaram atividade antifúngica *in vitro* contra diferentes espécies de *Candida*, entre elas *C. albicans* e *C. tropicalis* (ALVES et al., 2014).

Esses compostos fenólicos apresentam ainda comprovada ação antifúngica sendo que esta pode ocorrer, entre outros mecanismos, através da inativação de sistemas enzimáticos do microrganismo envolvido na produção de energia e também na síntese de componentes estruturais (PORTE et al., 2001). A presença de taninos condensados poderia explicar a

atividade biológica do EEFPa, pois segundo Simões et al. (2002), estes apresentam atividade fungicida. Sitheeque et al. (2009) verificaram o efeito antimicrobiano dos polifenois e catequinas em várias espécies do gênero *Candida*, e relataram que as substâncias possuiam atividade antifúngica em todas as espécies analisadas principalmente em *C. albicans*.

Em trabalho realizado por Morais (2015), foi verificado que o extrato de *Licania rigida* demonstrou atividade anti-*Candida*. Resultado também observado neste estudo. Alguns mecanismos de ação dos flavonóides foram descritos, dentre esses tem-se a desregulação da síntese de ácidos nucleicos e a capacidade de causar disfunção mitocondrial (SILVA et al., 2014).

No que se refere a modulação de substâncias, diversas plantas apresentam produtos do seu metabolismo secundário que podem ser boas substâncias para a terapia combinada, seus mecanismos de ação podem ter relação com o aumento da permeabilidade da membrana celular externa, através da inibição das modificações do sítio ativo do fármaco, inibição de bombas de efluxo ou evitando a inativação do antibiótico por meio da degradação ou modificação enzimática (HEMAISWARYA et al., 2008).

Entre os fatores de virulência do gênero *Candida*, tem-se o pleomorfismo, que concede a este a passagem de fungo comensal para fungo patogênico, através da transição de levedura para fungo filamentoso, conferindo a este um alto poder de penetração nos tecidos (MELO; GUERRA, 2014). As hifas verdadeiras se desenvolvem a partir de uma estrutura inicial, o tubo germinativo, e o citoplasma se encontra dividido por septos, já as pseudohifas formam-se por gemulação a partir da célula de levedura, verificando-se a ausência de septos, em que as gêmulas formadas não se desprendem da célula-mãe, constituindo um protoplasma contínuo (DEORUKHKAR & SAINI, 2015). Esse pleomorfismo é significativo para a patogenicidade desse gênero, e está envolvido no seu processo de infecção (MAYER et al., 2013).

A atividade antifúngica dos azólicos, grupo ao qual o Fluconazol pertence, reside na capacidade de inibir o citocromo P450 fúngico, por meio da demetilação da enzima 14-α-demetilase, enzima essa que envolvida na síntese de ergosterol. Com o bloqueio da síntese de ergosterol, há acúmulo de produtos tóxicos, alteração de permeabilidade da membrana e inibição do desenvolvimento celular fúngico (CUENCA-ESTRELLA, 2014). Acredita-se que esse bloqueio tenha contribuido para a completa inibição da filamentação de uma das cepas utilizadas nesse estudo.

A atividade antimicrobiana dos flavonoides quercetina e luteolina, foi testada frente a *Candida* spp., por Canonico et al. (2014), como resultado foi observado que os compostos

fenólicos apresentaram um potencial de inibitório na transição morfológica das leveduras, impedindo assim o desenvolvimento dos possíveis fenótipos exibidos por *C. albicans*, devido a danos causados a membrana, a transição morfológica das hifas foi reduzida e consequentemente, a infecção reduzida. Dados que corroboram com os obtidos nesse estudo, uma vez que o extrato conseguiu diminuir o processo filamentoso em uma das cepas utlizadas.

As espécies de *Candida* apresentam diferenças quanto a sua formação de biofilmes, resistência, características morfológicas e de matriz extracelular (CAVALHEIRO; Teixeira, 2018). Os biofilmes maduros são muito mais resistentes à terapia antifúngica e a fatores imunológicos do hospedeiro em comparação com células de levedura planctônicas (FANNING e MITCHELL, 2012). Essa variabilidade aumenta o desafio de encontrar uma solução eficaz para enfrentar as ameaças dos biofilmes causados por esses patógenos (CAVALHEIRO et al., 2018).

O EEFPa não apresentou atividade significativa na redução do biofilme na concentração utilizada, quando comparado ao tratado com o Fluconazol. Essa não efetividade possivelmente se deu devido à estrutura do biofilme, pois esta contribui para a tolerância dos microrganismos aos agentes antimicrobianos, e a matriz extracelular age como uma espécie de barreira, impedindo a penetração de substâncias. Quando há o estabelecimento do biofilme, este pode tolerar agentes antimicrobianos em concentrações de 10-1000 vezes maiores que as utilizadas na eliminação de células planctônicas (BUENO,2014; AKBARI et al., 2015).

Os biofilmes mostram-se fenotipicamente diferentes das células planctônicas (RAMAGE et al., 2012). As células livres precisam de mudanças genéticas para se tornar menos susceptíveis ao tratamento com antifúngicos, os biofilmes persistem devido à sua densidade populacional, mostrando um fenótipo resistente sem recorrer a alterações genéticas (SARDI et al., 2013). Através de vários estudos realizados, tem sido observado que as infecções causadas por biofilmes têm uma maior taxa de mortalidade do que as causadas por células planctônicas, isso ocorre devido esses serem menos susceptíveis a antifúngicos do que as células planctônicas, tornando a sua infecção mais difícil de tratar (UPPULURI et al., 2010; FANNING et al., 2012).

Tobaldini-Valerio et al. (2016), utilizaram o extrato de própolis contra espécies de *Candida* tanto em células planctônicas quanto em biofilme, e estes atribuiram a atividade inibitória aos flavonóides presentes no extrato. Os compostos fenólicos prejudicam o crescimento e formação de biofilmes em *C. albicans* possivelmente por meio da supressão de genes responsáveis pela adesão e morfogênese (SHAHZAD et al., 2014). O resultado observado

nesse estudo com a cepa *C. albicans* URM 5900 quando tratada com o EEFLr, possivelmente ocorreu devido a ação dos flavonoides.

Os compostos presentes no EEFPa, como as Proantocianidinas apresentaram atividade candidicida e foram capazes de inibir a formação de biofilme de *C. albicans*, com ação semelhante aos antifúngicos convencionais, como anfotericina e fluconazol (LUIZ et al., 2015). No entanto mesmo observando-se a presença desse composto no extrato, o mesmo não foi capaz de reduzir a formação do biofilme na concentração testada.

Nos biofilmes formados pelos isolados clínicos de *C. albicans* URM 5900 e INCQS 40006 e tratados com o antifúngico, foram observadas variações na resposta ao tratamento, evidenciando diferenças nas características inerentes destes isolados. A redução na biomassa dos biofilmes de espécies de *C. albicans* já foi demonstrada em estudos anteriores (PANARIELLO et al. 2018; WHALEY et al., 2017).

Outras espécies de *Candida* não-*C. albicans*, como *C.krusei*, são intrinsecamente resistentes ao antifungico Fluconazol (ARENDRUP et al., 2017). Em nosso estudo, os biofilmes formados pelos isolados URM5840 e URM4263 de *C. krusei* demonstraram redução dos biofilmes tratados após 48 horas de exposição ao fluconazol. Embora esta cepa seja naturalmente resistente a este fármaco, o mecanismo preciso não foi completamente elucidado (WHALEY et al., 2017). Morais (2015) em seu trabalho verificou que essa espécie mostrou-se sensível ao fluconazol.

O biofilme de *C. tropicalis* exibiu uma resistência ao fluconazol, como observado em biofilmes de diferentes espécies de *Candida* (JAIN et al., 2007). Em estudo realizado por Rajasekharan et al. (2014) foi observada redução do biofilme de *C. tropicalis* quando tratado com o flavonóide quercetina. Essa redução também foi observada em nosso estudo.

São necessários maiores estudos com as plantas *P. americana* e *L. rigida* para verificar muitas das propriedades biológicas e farmacológicas de seus compostos, para que haja uma compreensão e confirmação de suas indicações terapêuticas. Este estudo mostrou a efetividade dos extratos de *P. americana* e *L. rigida* na redução da CIM, do processo de filamentação dos mesmo frente às cepas utilizadas e na redução do biofilmes de algumas cepas, mostrando que estes podem considerados como uma possível fonte de substâncias bioativas com atividade antifúngica.

7 CONCLUSÃO

Na análise do Extrato Etanólico das Folhas *Persea americana* e do Extrato Etanólico das Folhas de *Licania rigida* pela técnica de UPLC-QTOF foi comprovada a presença de compostos fenólicos, já identificados por outras técnicas nesses gêneros. Ambos os extratos demonstraram atividade antifúngica significativa com alguns dos isolados testados. O extrato de *L. rigida* mostrou atividade moduladora de antifúngico. No processo de transição morfológica, o EEFPa foi capaz de reduzir o processo de filamentação, sendo o mesmo observado para o EEFLr . O extrato de *Persea americana* não mostrou resultados significativos no tratamento do biofilme das cepas testadas com as concentrações utilizadas nesse estudo, bem como a droga controle, Fluconazol, não foram observados resultados relevantes. Com o extrato de *Licania rigida* foram observados resultados significativos no tratamento do biofilme de algumas cepas analisadas, frente à droga controle, Fluconazol, também foram observados resultados relevantes com alguns dos isolados.

REFERÊNCIAS

ABBAS, J.; BODEY, G.P.; HANNA, H.A. *et al*. *Candida krusei* fungemia. An escalating serious infection in immunocompromised patients. **Archives of Internal Medicine,** 160, 2659–2664, 2000.

ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **Uningá Review**, 21, 55, 2015.

ADEYEMI, O. O.; OKPO, S. O.; OGUNTI, O. O. Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea americana* Mill (Lauraceae). **Fototerapia,** 73, 375-380, 2002.

AGNIESZKA, K.; MAGDALENA, K.; ISABEL, E. *et al*. Phenolic Compound Profiles and Antioxidant Capacity of *Persea americana* Mill. Peels and Seeds of Two Varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 60, 4613-4619, 2012.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA, J. M. F. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal Pharmacognosy**, 17, 1, 114-140, 2007.

AKBARI, F.; KJELLERUP, B.V. Elimination of Bloodstream insfections associated with *Candida albicans* Biofilm in Intravascular Catheters. **Pathogens** 4, 457–469, 2015.

ALCARAZ, M.L.; THORO, T.G.; HORMAZA, J.I. Phenological growth stages of avocado (*Persea americana*) according the BBCH scale. **Scientia Horticulturae**, 164, 434-439, 2013.

ALEXANDER, B. D.; JOHNSON, M.D.; PFEIFFER, C.D. *et al*. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. **Clinical Infectious Disease**, 56(12): 1724-1732, 2013.

AL-FATIMI, M. *et al*. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. **Journal of Ethnopharmacology**, 111, 657- 666, 2007.

AL-FATTANI, M.A.; DOUGLAS, L.J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: Chemical composition and role in drug resistance. **Journal of Medical Microbiology,** 55, 999–1008, 2006.

ALMEIDA, A.P; COSTA, S.S; MIRANDA, M.M.F.S., *et al*. Flavonol monoglycosides from the antiviral fractions of *Persea americana* (Lauraceae) leaf infusion**. Phyt Res,** 12, 562-567, 1998.

ALONSO, J. Tratado de fitofármacos y nutracéuticos. Rosário, Argentina. **Editora Corpus**, 2004.

ÁLVARES, C.A.; SVIDZINSKI, T.I.E.; CONSOLARO, M.E.L. Candidíase vulvovaginal: Fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 43(5), 319-327, 2007.

ALVES, C.T.; FERREIRA, I.C.; BARROS, L., *et al*. Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against *Candida* species. **Future microbiology**, 29 (2), 139-146, 2014.

ANDRADE, J.; Francisco, P. de *et al*. *Microsporum* ssp como causador de dermatofitoses: uma revisão. **Research, Society and Development**, 9, 5, 2020.

ARENDRUP, M.C.; PATTERSON, T.F. Multidrug-Resistant *Candida*: Epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. **Journal of Infectious Diseases**, 216, 445–451, 2017.

ARIF, T.; MANDAL, T.K.; DABUR, R. Natural products: Antifungal agents derived from plants. **Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry**, 81, 283 – 311, 2011.

ARNOLD, T.M.; DOTSON, E.; SAROSI, G.A.; HAGE, C.A. Traditional and emerging antifungal therapies. **Proceedings of the American Thoracic Society**, 7(3):222-8, 2010.

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

BAILLIE, G.S.; DOUGLAS, L.J. Matrix polymers of *Candida b*iofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 46, 397–403, 2000.

BÁRBARA, O.; HENRIQUES, O.C.; AZEVEDO, E.P.C., *et al*. *In vitro* TNF-α inhibitory activity of Brazilian plants and anti-inflammatory effect of *Stryphnodendron adstringens* in an acute arthritis model. **Evidence-Based Complementary Alternative Medicine**, 29872598, 2016.

BARBEDO, L.S.; SEGARBI, D. B. G. 2010. Candidíase. **Journal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis.** 22(1): 22-38, 2010.

BERRIDGE, M.V.; HERST, P.M.; TAN, A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. **Biotechnology Annual Review**, 11, 127–152, 2005.

BEZERRA, C. F.; ROCHA, J. E.; DO NASCIMENTO SILVA, M. K., *et al*. Analysis by UPLC-MS-QTOF and antifungal activity of guava (*Psidium guajava* L**.). Food and chemical toxicology**, 119, 122-132, 2018.

BIZERRA, F.C.; NAKAMURA, C.V.; DE POERSCH, C. *et al*. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. **FEMS Yeast Research**, 2008.

BOLES, B. R.; HORSWILL, A. R. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. **PLoS Pathogen**, 4, e1000052, 2008.

BRAI, B.I.C.; ODETOLA, A.A.; AGOMO, P.U. Hypoglycemic and hypocholesterolemic potential of *Persea americana* leaf extracts. **Journal of Medicinal Food,** 10: 356-360, 2007.

BRUMMITT, R. K. Vascular Plant Families and Genera, Royal Botanic Gardens: Kew. 1992.

BUENO, J. Anti-biofilm drug susceptibility testing methods: looking for newn strategies against resistance mechanism. **Journal of Microbial Biochemical Technology**, S3, 004, 2014.

BUTLER, G. Fungal Sex and Pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, 23(1), 140-159, 2010.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Brazilian Journal Medical and Biology Research**, 33: 179-189, 2000.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **Journal Ethnofarmacology**, 100, 131-134, 2005.

CANONICO, B.; CANDIRACCI, M.; CITTERIO, B. *et al.* Flavonoids inhibit *Candida albicans* morphogenesis by affecting DNA behavior and mitochondrial function. **Future Microbiology**, 9, 4, 445–456, 2014.

CARMO, E.D.; FAVARETTO, L.H.D.R.; PEREIRA, A.C., *et al.* Neoplasias malignas orais: estudo retrospectivo de 1962 a 2009. **Revista Brasileira Cirurgia de Cabeça Pescoço**, 40(2), 71-5, 2011.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J. *et al.* Antifungal agentes Mode in yeast cells. **Revista Espanhola de Quimioterapia**, 19, 130-139, 2006.

CARVALHO, G.H.; SILVA, H.H.G.; CUNHA, L.C. *et al*. Atividade inseticida do extrato bruto etanólico de *Persea americana* (Lauraceae) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista de Patologia Tropical**, 40, 348-361, 2011.

CASTRO, L. L. *et al.* Prevalence of fungemia in a tertiary hospital: Analysis of the last decade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 62, 4, 315-319, 2016.

CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M.C. *Candida* Biofilms: Threats, challenges, and promising strategies. **Frontiers of Medicine**, 5, 1–15, 2018.

CHANDRA J.; KUHN D.M.; MUKHERJEE P.K. *et al.* Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **Journal of Bacteriology**, 183:5385–94, 2001.

CLEFF, M.B. *et al*. Perfil de suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de animais ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, 14, 1, 43-9, 2012.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard - Fourth Information Supplement. CLSI document M27-S3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

CORRÊA, M.P.; PENNA, L.A. Dicionário das Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. 1 ed. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1984.

COUTINHO, H. D. M. *et al*. Atividade antimicrobiana de produtos naturais. **Revista Conceitos**, 10, 10, 77-85, 2004.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; LIMA, E. O. *et al*. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. Chlorpromazine. **Chemoterapy** 54, 4, 328-330, 2008.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads, **Biochimica et Biophysica Acta**, 1830, 3670–3695, 2013.

CUENCA-ESTRELLA, M. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. **Revista Espanhola Quimioterapia**, 23, 4, 169-176, 2010.

CUENCA-ESTRELLA, M. Antifungal Drug Resistance Mechanisms in Pathogenic Fungi: From Bench to Bedside. **Clinical Microbiology and Infection** 20, 54–59, 2014.

DALAZEN, D. Avaliação do perfil de susceptibilidade de isolados clínicos orais e vulvovaginais de *Candida* spp. aos antifúngicos anfotericina b, fluconazol e miconazol. Monografia - Universidade Comunitária da região de Chapecó – UNOCHAPECÓ, 2010.

DE VASCONCELOS, A.A.JR.; MENEZES, E.A.; CUNHA, F.A. 2011. Chromogenic medium for direct susceptibility testing of *Candida* spp. Isolated from urine. **Mycopathologia** 172(2):125-30, 2011.

DEORUKHKAR, S. C.; SAINI, S.; MATHEW, S. Non-*albicans Candida* infection: an emerging threat. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, 1– 7, 2014.

DIERKES, G.; KRIEGER, S.; DÜCK, R.; BONGARTZ, A. *et al.* Highperformance liquid chromatography–mass spectrometry profiling of phenolic compounds for evaluation of olive oil bitterness and pungency. **Agricultural Food Chemistry**, 60, 7597–7606, 2012.

DONLAN R.M. 2001. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin. Infect. Dis.* 33(8): 1387-92.

DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. Emerging Infectious Diseases. CDC **Centers for Disease Control and Prevention**. Atlanta, Georgia: USA, 2002.

DOUGLAS, L.J. Medical importances of biofilms in Candida infections. **Revista Iberoamericana de Micologia**, 19: 139-143, 2002.

ERNST, E. J. M. E.; KLEPSER, M. E.; ERNST, S. A. *et al*. *In vitro* pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by time-kill methods. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease** 33**,** 75-80, 1999.

FANNING, S.; MITCHELL, A.P. Fungal biofilms. **PLoS Pathogens**, 8, e1002585, 2012.

FARIAS, D. F. *et al*. 2013. Antibacterial, antioxidant and anticholinesterase activities of plant seed extracts from Brazilian semiarid region. **BioMed Research International**, 2013, 2013.

FIGUEIRAL, M. *et al*. Effect of denture-related stomatitis fluconazole treatment on oral *Candida albicans* susceptibility profile and genotypic variability. **The open dentistry journal**, 9, 46-51, 2015.

FOX, E.P.; NOBILE, C.J. A sticky situation: untangling the transcriptional network controlling biofilm development in *Candida albicans*. **Transcription** 3:315–22, 2012.

FUKUOKA, T.; JOHNSTON, D.A.; WINSLOW, C.A. *et al.* Genetic basis for differential activities of fluconazole and voriconazole against *Candida krusei*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 47: 1213–1219, 2003.

GESSLER, M. C.; MSUYA, D. E.; NKUNYA, M. H. H. *et al*. Traditional healers in Tanzania: the perception of malaria and its causes. **Ethnopharmacology,** 48, 119-130, 1995.

GOMEZ-CARAVACA, A.M.; LOPEZ-COBO, A.; VERARDO, V. et al. Evaluation of phenolic content in avocado fruit and its by-products. **Food Beverages**. 2015.

GUNASEKARA, T.; RADHIKA N.; RAGUNATHAN, K.K. Determination of Antimicrobial Potential of Five Herbs used in Ayurveda Practices against *Candida albicans, Candida parapsilosis* and Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. **Ancient Science of life**, 36:187-90, 2017.

HALL, R.A.; GOW, N. Mannosylation in *Candida albicans*: role in cell wall function and immune recognition. **Molecular Microbiology**, 90:1147–61, 2013.

HANNICKEL, S.; ZAGO, M.M.F.; BARBEIRA, C.B.S.; SAWADA, N.O. O comportamento dos laringectomizados frente à imagem corporal. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 48(3), 333-339, 2002.

HEERES, J.; MEERPOEL, L.; LEWI, P. Conazoles. **Molecules**, *15*, 4129, 2010.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A.K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, 15, 8, 639-652, 2008.

HIBBET, J.; SMADJA, H. K. Chemical Composition and in Vitro Antimicrobial Activities of the Jawetz, E.; Melnick, L. J.; Adelberg, E. A. **Microbiologia Médica**, Ed. Artmed, 7, 568, 2007.

HURTADO-FERNÁNDEZ, E.; PACCHIAROTTA, T.; GÓMEZ-ROMEROA, M. et al. Ultrahigh performance liquid chromatography-time of flight mass spectrometry for analysis of avocado fruit metabolites: method evaluation and applicability to the analysis of ripening degrees. **Journal of Chromatography**, 1218, 7723–7738, 2011.

JAIN, N.; KOHLI, R.; COOK, E. *et al*. Biofilm formation by and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from urine. **Applied Environmental Microbiology**, 73, 1697–1703, 2007.

KOJIC, E.M.; DAROUICHE, R.O. *Candida* infections of medical devices. **Clinical Microbiology Reviews,** 17(2), 255-67, 2004.

KROM, B.P.; COHEN, J.B.; FESER, G.E.M.; CIHLAR, R.L. Optimized *candida* biofilm microtiter assay. **Journal Microbiological Methods,** 68, 421–423, 2007.

LANA, D. F. D. *et al*. Dermatofitoses: agentes etiológicos, formas clínicas, terapêutica e novas perspectivas no tratamento. **Clinical & Biomedical Research**, 36, .4, 230-241, 2016.

LEITE, J. G.; BRITO, E. H. S.; CORDEIRO, R. A. *et al*. Composição química, toxicidade, atividade larvicida e antifúngica de extratos de semente de *Persea americana* (abacate). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 42, 2, 110-113, 2009.

LINGGUANG, Y.; PEIPEI, Y.; HANG, F. *et al*. Response surface methodology optimization of ultrasonic-assisted extraction of acer truncatum leaves for maximal phenolic yield and antioxidant activity. **Molecules**, 22, 232, 2017.

LUIZ, R.L.F.; VILA, T.V.M.; MELLO, J.C.P. et al. Proanthocyanidins polymeric tannin from *Stryphnodendron adstringens* are active against *Candida albicans* biofilms. **BioMed. Central Complementary Alternative Medicine,** 15, 68, 2015.

LYON, J.P.; RESENDE, M.A. Evaluation of adhesion to buccal epithelial cells in *Candida* species obtained from denture wears after exposure to fluconazol. **Mycoses**. 50, 21-24, 2006.

MARQUES, C. A. Importância econômia da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**, 8, 1, 195-206, 2001.

MARCOS-ZAMBRANO, L.J.; ESCRIBANO, P.; BOUZA, E.; GUINÉ, J. Produção de biofilme por *Candida* e não *Candida* spp. isolados causadores de fungemia: comparação da produção de biomassa e atividade metabólica e desenvolvimento de pontos de corte. **International Journal of Medical Microbiology**, 304, 1192-1198, 2014.

MATOS, F.J.A. **Farmácias vivas**. (4 ed.) Fortaleza: Editora UFC. P. 36-40, 2002.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence,** 4, 119–128, 2013.

MELO, I., GUERRA, R. Candidíase oral: um enfoque sobre a estomatite por prótese. **Salusvita.** 33(3), 389-414, 2014.

MESSIER, C.; EPIFANO, F.; GENOVESE, S.; GRENIER, D. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation and yeast-hyphal transition by 4-hydroxycordoin. **Phytomedicine.** 18(5):380–3, 2011.

MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A. C. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira Farmacognosia**, 15, 316-320, 2005.

MITCHELL, K.F.; ZARNOWSKIA, R.; SANCHEZA, H. *et al*. Community participation in biofilm matrix assembly and function. **Proocedings National Academy of Sci*ence***, 112:4092–7, 2015.

MONTOVANI, P. A. B.; GONÇALVES JÚNIOR, A. C.; MORAES, A. et al. Atividade antimicrobiana do extrato de capororoca (*Rapanea* sp.). **Revista Brasileiro de Agroecologia**, 4, 2, 3764-3767, 2009.

MORAES, R. G.; LEITE, I. C.; GOULART, E. G. **Parasitologia e micologia humana**. 5 ed. Rio.

MORAIS, L.V. Atividade antimicrobiana e antioxidante de *Licania rigida* e *Turnera ulmifolia*. In: Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, Natal – RN. 2015.

MUKHERJEE, P. K.; CHANDRA, J. "*Candida* biofilm resistance." **Drug Resistance Updat**es, 7, 4–5, 301–309, 2004.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL. K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 7ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2014.

NEGRI, M.; MARTINS, M.; HENRIQUES, M. *et al.* Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. **Mycopathologia,** 169, 175-182, 2010.

Negri, M.; Silva, S.; Henriques, M.; Oliveira R. Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. **European Journal of Clinical Microbiology**; **Infectious Diseases** 31, 1399-1412, 2012.

NETT, J.; LINCOLN, L.; MARCHILLO, K. *et al*. Putative role of β-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 51, 510–520, 2007.

NEVILLE, B.W.; DAMM, D.D.; ALLEN, C. M.; BOUQUOT, J. E. **Patologia Oral e Maxilofacial**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 972. 2009.

O'DONNELL, L. E.; ROBERTSON, D.; RAMAGE, G. *Candida* Virulence Factors. In: **Oral Candidosis**. Springer Berlin Heidelberg 7-19. 2015.

OJEWOLE, J.A.O.; AMABEOKU, G.J. Anticonvulsant effect of *Persea americana* Mill (Lauraceae) (Avocado) leaf aqueous extract in mice. **Phytotherapy Research**, 20, 696-700, 2006.

OLIVEIRA, V. K. P. *et al*. Fungemia caused by *Candida* species in a children's public hospital in the city of São Paulo, Brazil: study in the period 2007-2010. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 56, 4, 301-305, 2014.

OROZCO, A.S.; HIGGINBOTHAM, L.M.; HITCHCOCK, C.A.; PARKINSON, T. *et al*. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 42: 2645–2649, 1998.

ORTEGA, L.M., *et al*. Nonradioactive method to detect native single-stranded G-tails on yeast telomeres using a modified Southern blot protocol. **Biotechniques** 50(6):407-10, 2011.

OWOLABI, M.A.; JAJA, S.I.; COKER, H.A.B. Vasorelaxant action of aqueous extract of the leaves of *Persea americana* on isolated thoracic rat aorta. **Fitoterapia,** 76: 567-573, 2005.

PANARIELLO, B.H.D.; KLEIN, M.I.; MIMA, E.G.D.O.; PAVARINA, A.C. Fluconazole impacts the extracellular matrix of fluconazole-susceptible and -resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. **Journal Oral Microbiology**, 10, 1476644, 2018.

PANNANUSORN, S.; FERNANDEZ, V.; RÖMLING, U. Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection. **Mycoses**, 56(3), 264-272, 2013.

PARAAKH, M. P.; RAVICHANDRA, V. D. Natural Compounds as Anti-Microbial Agents with *In Silico* Technique: A Review. **International Journal of Pharma Research and Health Sciences**, 4 (4), 1252-1260, 2016.

PARRA PESSOA, I.; LOPES NETO, J.; SILVA DE ALMEIDA, T. *et al*. Polyphenol Composition, Antioxidant Activity and Cytotoxicity of Seeds from Two Underexploited Wild *Licania Species: L. rigida* and *L. tomentosa*. **Molecules**, 21(12), 1755, 2016.

PEREIRA, D. G. Importância do Metabolismo no Planejamento de Fármacos. **Química Nova,** 30, 171, 2007.

PFALLER, M. A.; MOET, G. J.; MESSER, S. A. *et al*. Variations in Species Distribution and Echinocandin and Azole Antifungal Resistance Rates among *Candida* Bloodstream Infection Isolates: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009). **Journal of Clinical Microbiology**, 49, 1, 396–399, 2011.

PFALLER, MICHAEL A. *et al.* Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-albicans species of Candida in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004–2008. **PloS one** 9, 7, 2014.

Pierce, Christopher G. *et al*. 2017. The *Candida albicans* Biofilm Matrix: Composition, Structure and Function**.** *Journal of Fungi* 3, 1, 1-8.

PORTE, A.; GODOY, R. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades Antimicrobiana e Química do Óleo Essencial. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**. 19. 10.5380/cep.v19i2.1233, 2005.

PRESTA, G. A.; PEREIRA, N. A. Atividade de abagerú (*Chrysobalanus icacco* L.) em modelos experimentais para o estudo de plantas hipoglicemiantes. **Revista Brasileira Farmácia**, 68, 91-101, 1987.

QUINET, A.; ANDREATA, R. H. P. Lauraceae Jussieu na Reserva Ecológica de Macaé de Cima, município de Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, 53(82), 59-121, 2002.

RAJASEKHARAN, S.K.; RAMESH, S.; BAKKIYARAJ, D. Synergy of flavonoids with HDAC inhibitor: New approach to target *Candida tropicalis* biofilms. **Journal of Chemotherapy**, 27, 246–249, 2014.

RAMAGE, G.; BACHMANN, S.; PATTERSON, T. F. *et al*. "Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms," *Journal Antimicrobial Chemother*apy, 49(6), 973–980, 2002.

RAMAGE, G.; BACHMANN, S.; PATTERSON, T.F. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, 49, 973–980, 2002.

RAMAGE, G.; MOWAT, E.; JONES, B. Our current understanding of fungal biofilms. **Critical in Reviews Microbiology,** 35:340–55, 2009.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; WILLIAMS, C. "Fungal biofilm resistance," **International Journal Microbiology,** 1–14, 2012.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. **International Journal of Food Microbiology**, 521–528, 2012.

RAMAGE, G.; SAVILLE, S.P.; THOMAS, D.P.; LOPEZ-RIBOT, J.L. *Candida* biofilms: an update. **Eukaryot. Cell**, 4:633–638, 2005.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, 39: 603- 613, 2001.

RODRÍGUEZ-CARPENA, J.G.; MORCUENDE, D.; ANDRADE, M. J. Avocado (*Persea americana* Mill.) phenolics, *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 59, 5625−5635, 2011.

ROHWER, J. G. Lauraceae. In: KUBITZKI, K.; ROHWER, J. G.; BITTRICH, V. (eds.). The families and genera of vascular plants. **Springer-Verlag**, Berlin. 2, 366-391, 1993.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Revieus Immunology** 11, 275-288, 2011.

ROSALINDA, C. T.; ALICIA, G. G.; RIKKAMAE, Z. M. L.W. Larvicidal activity of *P. americana* Mill. against *Aedes aegypti*. **Asian Pacific Journal Tropical Medicine** (Suppl1):S167-S170, 2014.

SAHU, J.K.; GANGULY, S.; KAUSHIK, A. Triazoles: A valuable insight into recent developments and biological activities. **Chinese Journal of Natural Medicines**, 11, 456 – 465, 2013.

SALAS, P.M.; CÉLIZ, G.; GERONAZZO, H. *et al*. Antifungal activity and enzymatically – modified flavonoids isolated from Citrus species. **Food Chemistry**, 124, 1411-1415, 2011.

SALERNO, C.; PASCALE, M.; CONTALDO, M. *et al. Candida*-associated denture stomatitis. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirurgia Bucal,** 16(2):139-43, 2011.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLÖRL. *Candida* Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, 58, 2, 2-13, 2015.

SARDI, J.C.O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T. et al. 2013. "*Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options," **Journal of Medical Microbiology**, 62(1), 10–24, 2013.

SESMA, N.; MORIMOTO, S. Estomatite protética: Etiologia, tratamento e aspectos clínicos. **Journal of Biodentistry and Biomaterials.** 2, 24-29, 2011.

SHAHZAD, M.; SHERRY, L.; RAJENDRAN, R. *et al*. Utilising polyphenols for the clinical management of *Candida albicans* biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents,** 44, 269–273, 2014.

SHIELDS, R. K.; NGUYEN, M. H.; PRESS, E. G. *et al.* 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*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** 56, 9, 4862–4869, 2012.

SIDRIM J.J.; ROCHA, M.F.G. Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos. 1ed., Rio de Janeiro. **Guanabara Koogan** S.A. 41-49; 89- 101. 2010.

SIDRIM, J. J. C.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G. Aspectos clínicos laboratoriais das dermatofitoses. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Editora **Guanabara Koogan**, 14, 135-161, 2004.

SILVA, A. Estomatite protética. Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Fernando Pessoa. 2010.

SILVA, A.P., MIRANDA, I.M., LISBOA, C. Prevalence, distribuition and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis, C. orthoparapsilosis,* and *metapsilosis* in tertiary care hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, 47 (8), 2392-2397, 2009.

SILVA, C.R.; ANDRADE-NETO, J.B.; CAMPOS, R.S. *et al*. Synergistic effect of the flavonoid catechin, quercetin, or epigallocatechin gallate with fluconazole induces apoptosis in *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 58, 1468–1478, 2014.

SILVA, P. Fármacos Antifúngicos. **Farmacologia.** 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 108. P.1071-1078, 2006.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M. *et al*. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews,** 36:288–305, 2012.

SILVA-DIAS, A. *et al*. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. **Frontiers in microbiology**, 6, 205 2015.

SIMÕES, C.M.O. *et al*. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre: Ed., UFSC/UFPR. 2007.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G. *et al*. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre/Florianópolis : Ed. Universidade/UFRGS -Ed. da UFSC. 2002.

SIMÕES, M. O *et al*. 2003. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ UFSC, 1102, 2003.

SITHEEQUE, M.A.M.; PANAGODA, G.P.; YAU, J. *et al*. Antifungal activity of black tea polyphenois against *Candida* species. **International Journal Experimental and Clinical Chemotherapy**, 55 (3), 189-6, 2009.

Soares Santos, E.; de Morais Oliveira, C. D.; Rose Alencar Menezes, I. *et al.* Anti-Inflammatory Activity of herb products from *Licania rigida Benth.* **Complementary Therapies in Medicine**. 45, 254–261, 2019.

SOKOVIC, M.; GLAMOCLIJA, J.; CIRIC, A. Natural products from plants and fungi as fungicides. In: Nita M (ed) Fungicides-showcases of integrated plant disease management from around the world. **InTech.** New York, 185-232, 2013.

SOUSA, F.A.C.G.; PARADELLA, T.C.; ROSA, L.E.B.; LEITE, H.F. Carcinoma epidermóide em mucosa bucal: um breve levantamento. **Revista Faculdade de Odontologia**, 49(1), 5-7, 2008.

SPANAKIS, E.K.; APERIS, G.; MYLONAKIS, E. New agents for the treatment of fungal infections: clinical efficacy and gaps in coverage. *Clinical Infectious Disease*, 43, 1060–1068, 2006.

SUZUKI, L. C. Desenvolvimento de biofilme formado por *Candida albicans in vitro* para estudo da terapia fotodinâmica. Tese (Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear - Matérias) - Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009.

TAFF, H.T.; NETT, J.E.; ZARNOWSKI, R. *et al. Candida* biofilm-induced pathway for matrix glucan delivery: Implications for drug resistance. **PLoS Pathogens**, 8, e1002848, 2012.

TAN, X.; FUCHS, B. B.; WANG, Y. *et al.* The role of *Candida albicans* SPT20 in filamentation, biofilm formation and pathogenesis. **Plos one**. 2014.

THEIN, Z. M.; SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L.P. *In vitro* biofilm formation of *Candida albicans* and *non-albicans Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. **Archives of oral biology**, 52, 8, 761-767, 2007.

TOBALDINI-VALERIO, F.; BONFIM-MENDONÇA, P.S.; ROSSETO, H.C. *et al*. 2016. Propolis: A potential natural product to fight *Candida* species infections. **Future Microbiology**, 11, 1035–1046, 2016.

UPPULURI, P.; CHATURVEDI, A.K.; SRINIVASAN, A. *et al*. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. **PLoS Pathogens,** 6(3) e1000828, 2010.

VEIGA-JUNIOR, V.F.; MELLO, J.C.P. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** 18, 464-471, 2008.

VENKATESWARLU, K.; DENNING, D.W.; MANNING, N.J.; KELLY, S.L. Reduced accumulation of drug in *Candida krusei* accounts for itraconazole resistance. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 40: 2443–2446, 1996.

VITA, D.S.; GIUSEPPE, A.; DAVID, B. *et al*. Quantitative evaluation of the phenolic profile in fruits of six avocado (*Persea americana*) cultivars by UHPLC–HESI-MS. **International Journal Food Properties**, 20(6), 1302– 1312, 2017.

WHALEY, S. G.; BERKOW, E. L.; RYBAK, J. M. *et al*. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans Candida* Species. **Frontiers in Microbiology**, 7, 2173, 2016.

WISPELWEY, B.; PARSOSNS, C.H. Agentes antifúngicos. In: MINNEMAN, K.P.; WECKER, L. (Ed). Brody: **Farmacologia Humana**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 50, 593-602, 2006.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive Candidiases. **Therapeutics and Clinical risk management,** 10:95-105, 2014.

ZOMORODIAN, K.; HAGHIGHI, N.N.; RAJAEE, N. *et al*. Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. **Medical Mycology**, 49, 208-211, 2011.