



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DE ÓLEOS
ESSENCIAIS EXTRAÍDOS DE *Buchenavia tetraphylla***

JOSÉ ROBSON NEVES CAVALCANTI FILHO

Orientadora: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Co-orientador: Dr. Luís Cláudio Nascimento da Silva

Recife - PE

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DE ÓLEOS
ESSENCIAIS EXTRAÍDOS DE *Buchenavia tetraphylla***

JOSÉ ROBSON NEVES CAVALCANTI FILHO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia.

Co-orientador: Dr. Luís Cláudio Nascimento da Silva

Recife - PE

2014

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

Cavalcanti Filho, José Robson Neves

Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de óleos essenciais extraídos de *Buchenavia tetraphylla* / José Robson Neves Cavalcanti Filho. – Recife: O Autor, 2014.

58 folhas: il.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia,

Coorientador: Luís Claudio Nascimento da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2014.

Inclui bibliografia

1. Plantas medicinais 2. Plantas da caatinga 3. Fungos patogênicos 4. *Cândida albicans* I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orient.) II. Silva, Luís Cláudio Nascimento da (coorient.) III. Título.

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-253

JOSÉ ROBSON NEVES CAVALCANTI FILHO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS
EXTRAÍDOS DE *Buchenavia tetraphylla***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre.

APROVADO EM: 17/09/2014

BANCA EXAMINADORA

PROF.^a. DR^a MARIA TEREZA DOS SANTOS CORREIA
ORIENTADORA (PRESIDENTE)

PROF^a DR^a NORMA BUARQUE DE GUSMÃO
1º EXAMINADOR

PROF.^a. DR^a MÁRCIA VANUSA DA SILVA
2º EXAMINADOR

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tudo que ele colocou em minha vida, principalmente os meus pais. Sem eles não poderia chegar aonde cheguei e nem concluir essa nova etapa da minha vida. As minhas irmãs e minha sobrinha por toda a compreensão, carinho, atenção e por ter acreditado em mim. Aos meus tios, primos e avós que mesmo indiretamente me ajudaram muito com força e amor.

A minha professora e primeira orientadora Norma Gusmão, por ter me aceitado e me conduzido para o caminho da pesquisa e da docência. O meu co-orientador Luís Cláudio por ter acreditado e confiado no meu potencial. A minha orientadora Tereza Correia por ter me aceito para está caminhada; e mesmo assim de coração aberto e confiou em mim. As professoras Márcia Vanusa, Leonor Alves e Kêzia Xisto por terem várias vezes me ajudado e orientado no meu caminho. A Seu João do laboratório de Produtos Naturais por ter me auxiliado e ensinado a realizar todos os procedimentos de extração.

Aos meus amigos UNINASSAU (Raissa, Ana Lygia, Maíra, Ana Carolina, Kleber, Tatiana, Fernanda, Laila e Bruna) que estavam presente desde do inicio da minha caminhada.

A minha família LAMAI/LAFEA (Flávia, Nelânia, Erik, Glêzia, Pérsio, Raul, Manu, Aliny, Maria Cláudia, Evelyne, Rosilma, Bruna, Nizza, Helena, Iasmin, Camila, Welma, Cassio, Diana, Rafael, Natalia, Luiz e Igor) por tudo.

Aos meus amigos de turma (Clovis, Cibebe, Paula, Renata, Sarah, Jan, Valdirene, Rebeca, Marcos, Fabiola, Marly e Diogo) por fazer com que as disciplinas da Pós fossem uma alegria só.

A meu amigo e parceiro da *B. tetraphylla* Tiago, por me ajudar a desenvolver minha pesquisa, fazer com que eu aprenda a orientar e organizar tudo.

Por ultimo, minhas duas “benças” Talyce Reis e Maira Callou, que tantas vezes me escutaram, me acalmaram, torceram por mim e acreditaram no meu profissionalismo. Obrigado por tudo e a todos!

RESUMO

A frequência de infecções fúngicas invasivas devido a fungos patógenos oportunistas aumentou claramente nos últimos anos, sendo *Candida albicans* responsável por grande parte dos casos. Esta levedura pode causar infecções superficiais de pele e mucosas, é a espécie mais encontrada nas infecções vaginais. Assim, é importante a busca de novas fontes de moléculas bioativas anti-*C. albicans*. *Buchenavia tetraphylla* (Combretaceae) é uma espécie neotropical, distribuída desde Cuba ao Rio de Janeiro, sendo uma planta etnomedicinal utilizada por comunidades tradicionais da região Nordeste do Brasil. Em pesquisa recente utilizando folhas da *B. tetraphylla* foi comprovada sua atividade antimicrobiana. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de extratos orgânicos de folhas de *Buchenavia tetraphylla* frente a *Candida albicans*, além de analisar o potencial citotóxico e antioxidante do extrato mais ativo. A triagem fitoquímica foi realizada por cromatografia em camada delgada, onde foram observada a presença de hidrocarbonetos, açúcares, glicosídeos, terpenos, taninos e flavonóides. A atividade antimicrobiana, foi determinada pelo método de microdiluição em caldo utilizando 10 linhagens de *C. albicans*. Os valores de CMI dos extratos variaram a partir de 0,15625 mg/mL a 2,5 mg/mL. Como o extrato metanólico apresentou melhor resultado anti-*C. albicans*, sua ação combinada com fluconazol foi testada sendo observado efeitos aditivos e sinérgicos. Nas células tratadas com o extrato metanólico no valor do CMI foram observadas modificações externas, apresentando maiores rachaduras e encolhimento celular que podem ser atribuído à perda do volume citosólico. Em relação a atividade hemolítica do mesmo extrato testado acima, foi observado um IC₅₀ igual a $3,935 \pm 0,3088$ mg/mL e para atividade antioxidante um IC₅₀ de 64,66 ($\pm 1,81$ µg/mL). Assim, estes resultados estimulam novas pesquisas sobre aspectos farmacológicos e citotóxicos dos extratos de *B. tetraphylla* a fim de apoiar a sua aplicação como agente antimicrobiano.

Palavra-chave: Caatinga, Produtos naturais, Combretaceae, atividades antifúngicos, *Candida albicans*.

ABSTRACT

The frequency of invasive fungal infections due to opportunistic fungal pathogens has increased markedly in recent years, *Candida albicans* responsible for most cases. This yeast can cause superficial infections of skin and mucous membranes, is the species most commonly found in vaginal infections. Thus, it is important to search for new sources of bioactive molecules anti-*C. albicans*. *Buchenavia tetraphylla* (Combretaceae) is a neotropical species, distributed from Cuba to Rio de Janeiro, one etnomedicinal plant used by traditional communities of northeastern Brazil. In recent research using leaves of *B. tetraphylla* was proven antimicrobial activity. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of leaves extracts from *Buchenavia tetraphylla* against *Candida albicans* and the cytotoxic and antioxidant action of the most active extract. The phytochemical screening was performed by thin layer chromatography where the presence of hydrocarbons, sugars, glycosides, terpenes, tannins and flavonoids were detected. The antimicrobial activity was determined by the broth microdilution method using 10 strains of *C. albicans*. The MIC values of the extract ranging from 0.15625 mg/mL to 2.5 mg/mL. As the methanolic extract showed the best anti-*C. albicans* inhibition, its combined action with fluconazole was also tested and additive and synergistic effects were observed. In cells treated with methanolic extract at MIC value were observed external modifications, such as higher cracking and shrinking of cells which may be due to loss of cytosolic volume. Regarding the hemolytic and antioxidant activities, IC₅₀ values of 3.935±0.3088 mg/mL and 64.66±1.81 mg/mL were observed. Therefore, these results stimulate new research on pharmacological aspects, isolation and chemical characterization of compounds from *B. tetraphylla* leavess in order to support its application as an antimicrobial agent.

Keywords: Natural resources, Caatinga, Combracetaceae, antifungal activity, *Candida albicans*.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1- Mapa da localização do bioma Caatinga	14
Figura 2- <i>Buchenavia tetraphylla</i>	16
Figura 3- <i>C. albicans</i> (a-levedura e b- hifas)	18

Capítulo 2: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DOS EXTRATOS DE *Buchenavia tetraphylla*

Figura 1- Efeito do Extrato metanólico da <i>B. tetraphylla</i> em células de <i>Candida albicans</i>	48
Figura 2- Atividade hemolítica do Extrato metanólico da <i>B. tetraphylla</i>	50
Figura 3- Atividade antioxidante do Extrato metanólico da <i>B. tetraphylla</i>	51

LISTA DE TABELAS

DO ARTIGO

Capítulo 2: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DOS EXTRATOS DE *Buchenavia tetraphylla*

Tabela 1– Resultados da prospecção fitoquímica dos extratos de *B. tetraphylla* 42

Tabela 2- Suscetibilidade das linhagens de *C. albicans* aos antifúngicos testados 43

Tabela 3- Atividade antimicrobiana de *B. tetraphylla* dos extratos de frações polares. 39

Tabela 4- Ensaio sinérgico do Extrato metanólico da *B. tetraphylla* com o antifúngico fluconazol para a linhagem padrão UFPEDA 1007 de *C. albicans* e linhagens clínicas..... 41

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo Geral	11
2.2 Objetivos específicos	11
CAPÍTULO 1	12
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
1.1 Plantas medicinais	12
1.2 Caatinga.....	13
1.3 Familia combretaceae	14
1.4 <i>Buchenavia tetraphylla</i>	15
1.5 Aspectos gerais do gênero <i>Candida</i>	16
1.5.1.2 <i>Candida albicans</i> como um patógeno.....	17
1.6 Classificação dos Antifúngicos.....	18
1.6.1 Antifúngicos de origem vegetal	18
1.7 Atividade Sinérgica	19
1.8 Antioxidantes	20
2. REFERÊNCIA	22
CAPÍTULO 2	35
1. ARTIGO.....	35
CONCLUSÃO	58

1. INTRODUÇÃO

A cada ano, doenças causadas por micro-organismos têm acometido mais de dois milhões de pessoas, causando, muitas vezes, óbitos por serem resistentes a diversas drogas que se tornaram ineficazes para o tratamento das enfermidades causadas por esses agentes. Dentre estas, destacam-se as contaminações fúngicas que merecem grande atenção por apresentarem causa crescente de morbidade e mortalidade em hospitais de todo mundo (BRASIL, 2008; VIDIGAL, SVIDZNSKI, 2009).

Micro-organismos do gênero *Candida* estão dentre os mais comumente encontrados no homem, no entanto, a espécie *C. albicans* é a mais patogênica e de grande importância clínica. Esta levedura comensal pode ser encontrada nas mucosas bucal e vaginal, tendo alta capacidade de adesão nos tecidos. No entanto, por ser oportunista, alguns fatores predisponentes ao hospedeiro (mudança de pH vaginal, imunidade baixa, uso de antibióticos, anticoncepcionais, estresses e entre outros) favorece o seu crescimento e adesão, com consequente invasão dos tecidos e infecção se tornando uma levedura patogênica (ASSONI; ALMEIDA, 2013).

Devido a resistência de *C. albicans* à drogas já conhecidas, faz-se necessária a busca de novos compostos eficazes para o combate a essas leveduras que vêm causando mortes por todo o mundo. Os produtos de origem natural vêm sendo testados contra micro-organismos e já é comprovada sua eficácia na inibição desses patógenos. As plantas são fontes potenciais de moléculas com propriedades medicinais, pois possuem fontes de metabólitos secundários, com diversidade molecular muito superior àquelas derivadas de produtos sintéticos (YUNES; CECHINEL-FILHO, 2001, RODRIGUES et al., 2006, PAVLOVIC et al., 2012).

A caatinga é a única formação vegetacional exclusivamente brasileira, compreendendo uma área de aproximadamente 826.411 km², o que constitui 60% da região Nordeste do Brasil (GIL, 2002; MMA/IBAMA, 2010), abrangendo os estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e parte de Minas Gerais. A caatinga se destaca como um patrimônio biológico desta região, entretanto, dentre os biomas brasileiros, é o menos protegido, sendo ao mesmo tempo a região que mais sofre com a deterioração ambiental. Por estes e outros fatores, o estudo e a conservação da biodiversidade têm se tornado um grande desafio para os pesquisadores brasileiros (LEAL et al., 2003; GORLACH-LIRA; COUTINHO, 2007)

Portanto, diante do potencial biotecnológico das plantas da caatinga, a investigação da ação antimicrobiana dos extratos e a identificação dos mecanismos de ação relacionados, representa um passo fundamental para o uso destes compostos como produtos para as indústrias farmacêuticas, pois são de baixo custo e com eficácia já descrita na literatura, obtendo forte impacto no ponto de vista científico, social e econômico. Além disso, o Brasil é o país com maior área de florestas diversificada do planeta, porém, mesmo havendo um crescimento do conhecimento científico sobre a avaliação do potencial terapêutico das plantas, ainda há escassez de estudos sobre a grande maioria das espécies em âmbito mundial. Muitas das publicações se referem a ensaios empíricos com base no dito popular e apenas 1% das espécies vegetais foi validada por estudos científicos (LIMA et al., 2007; MONTES et al., 2009; FRANCISCO, 2010).

Estudos confirmam um grande potencial antimicrobiano capaz de inibir fortemente o crescimento de bactérias e fungos. Diante destas circunstâncias, faz-se necessário um estudo aprofundado dos metabólitos secundários em *B. tetraphylla*, que possam ser utilizados como propriedades farmacêuticas. Para isso, foi avaliada a atividade antimicrobiana de extratos orgânicos de *B. tetraphylla* contra isolados clínicos recentemente de *C. albicans* além de analisar as alterações ultraestruturais induzidas e o potencial citotóxico e antioxidante do extrato ativo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade anti-*Candida*, antioxidante e citotóxica de extratos de *Buchenavia tetraphylla* contra linhagens clínicas de *C. albicans*.

2.2 Objetivos específicos

- Obter e caracterizar os extratos orgânicos de *B. tetraphylla*;
- Mensurar a suscetibilidade das linhagens a drogas comerciais;
- Determinar a concentração Mínima Inibitória (CMI) e a Concentração Mínima Microbicida (CMM);
- Verificar o sinergismo dos produtos vegetais com antibiótico utilizado na prática;
- Analisar atividades antioxidantes do extrato metanólico de *Buchenavia tetraphylla*.
- Analisar a toxicidade utilizando eritrócitos humanos.
- Analisar alterações ultra-estruturais através da microscopia de varredura.

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Plantas medicinais

Desde início da humanidade as plantas têm sido utilizadas como um importante recurso para sociedade, como fontes de nutrientes e no tratamento de patologias. O uso de vegetais pela população vem se intensificando, principalmente em regiões onde o acesso ao cuidado de saúde formal é limitado, a seleção e aplicabilidade dependem dos sintomas, da disponibilidade de espécies na região, de aspectos culturais e educacionais (MAHABIR; GULLIFORD, 1997; RATES, 2001; AMOROZO, 2002; OLIVEIRA et al., 2007).

No Brasil, a utilização das plantas como fonte de medicamentos teve influências das culturas indígena, africana e europeia. Entre os índios, o pajé ou feiticeiro utilizava plantas entorpecentes para sonhar com o espírito que lhe revelaria a erva ou o modo de curar o enfermo e também pela observação de animais que procuram certas plantas quando doentes. Um exemplo é a aplicação da raiz da *Psychotria ipecacuanha* (nome popular Ipeca), pelos animais, para alívio de cólicas e diarreias. Os pajés associavam o uso de plantas a rituais de magia e seus tratamentos eram, assim, transmitidos oralmente de uma geração a outra (LORENZI; MATOS, 2002; JORGE; MORAIS, 2003).

As plantas são uma fonte excepcional de produtos naturais bioativos. Onde estes compostos são cruciais para o desenvolvimento de fármacos comercializados no mundo inteiro, devido a sua elevada diversidade molecular, sendo maior do que os compostos derivados dos processos de síntese química. Esta complexidade e variedade destes compostos metabólitos são resultados de influência física, química e biológica de produtos encontrados na natureza (BRESOLIN; CECHINEL-FILHO, 2003; ALVES, 2008; SHER, 2009).

Os metabólitos secundários estão especialmente relacionados com as propriedades terapêuticas das plantas sendo quatro as principais classes com significado para o homem: compostos fenólicos, terpenóides e alcalóides (NEVES; CUNHA, 2006).

Esses compostos são responsáveis pelos efeitos medicinais, ou tóxicos, das plantas, e eles apresentam grande importância ecológica, uma vez que podem atuar na atração de polinizadores,

ou representar uma defesa química contra estresse ambiental (LÓPEZ, 2006; RAVEN et al., 2007). Assim, estes metabólitos foram atribuídos às substâncias importantes no mecanismo de defesa das plantas contra seus predadores, sejam fungos, bactérias, vírus, parasitas, insetos, moluscos ou animais superiores. Além disso, em determinadas circunstâncias, algumas plantas superiores podem formar substâncias de natureza antimicrobiana, antifúngicas e antitumorais (YUNES; CALIXTO, 2001).

Em todo o território mundial, têm sido estabelecidas políticas de desenvolvimento do uso das plantas medicinais e fitoterápicas principalmente com envolvimento da Organização Mundial da Saúde (OMS). Essas medidas visam o acesso ao conhecimento sobre as plantas, o respeito aos princípios de segurança e eficácia na saúde, a pesquisa de novos fitoterápicos e a conciliação de desenvolvimento socioeconômico e conservação ambiental (BRASIL, 2001; 2006).

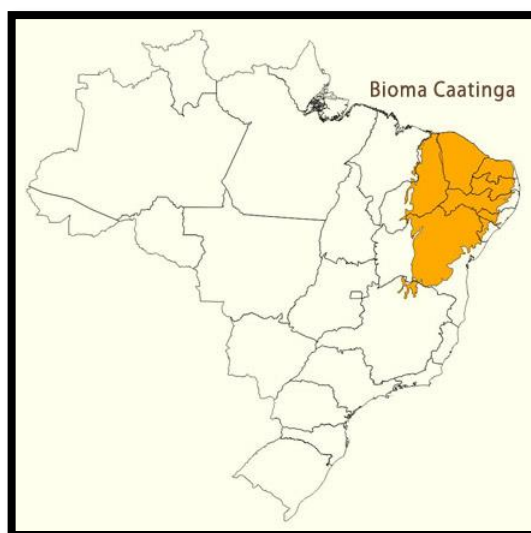
Há muitas iniciativas no país em relação às plantas medicinais, como o uso nos serviços público de saúde, por exemplo. Através do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, instituído no Brasil em 2008 pelo Ministério da Saúde, estabeleceu como metas inserir com segurança, eficácia e qualidade as plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS). Hoje, existe uma cartilha distribuída pelo governo com usos de 59 espécies vegetais certificadas em relação a sua ação terapêutica, havendo por meta listar 71 espécies para uso no SUS, estando elas em constante pesquisa (RESINUS, 2009; GIRALDI; HANAZAKI, 2010; SILVELLO, 2010; BRASIL, 2011).

1.2 Caatinga

A caatinga, bioma exclusivo brasileiro, compreende uma área de aproximadamente 900 mil km², representando 60% da região Nordeste e 11% do território do Brasil que abrange os estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais (FIGURA1) (ANDRADE et al., 2005).

A caatinga apresenta uma vegetação mais heterogênea dentre os biomas encontrados no Brasil, tendo como característica o potencial hídrico reduzido no solo com acentuado período de estação seca, entre sete e dez meses, sua flora nativa apresenta então caracteres anatômicos, morfológicos e funcionais especializados para a sobrevivência destas plantas às condições adversas de clima e solo (RIZZINI, 1997; SAMPAIO et al., 2002; ALBURQUERQUE et al., 2005).

Figura 1. Mapa do Brasil com a localização do bioma Caatinga



Fonte: <http://www.cerratinga.org.br/wp-content/uploads/2013/04/bioma-caatinga-mapa-do-brasil.jpg>

Este bioma tem uma vegetação bastante diversificada, sendo representada por aproximadamente 159 famílias, 1.141 gêneros e 4.547 espécies e dessas, 318 espécies são consideradas endêmicas (PRADO, 2003; GIULIETTI et al., 2004; FORZZA et al., 2013). Segundo Giullietti (2006), as principais famílias encontradas são: Leguminosae (278 espécies), Convolvulaceae (103 espécies), Euphorbiaceae (73 espécies), Malpighiaceae (71 espécies), Poaceae (66 espécies) e Cactaceae (57 espécies).

Pesquisas anteriores sobre a caatinga mostram que, além da importância biológica, este bioma encerra um considerável potencial econômico, com espécies de excelente uso como forragens, frutíferas e medicinais. Diversos autores produziram uma vasta literatura sobre o uso popular de plantas medicinais (ALBUQUERQUE, 2000; ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002; ALMEIDA; ALBUQUERQUE, 2002). Estudos têm comprovado a ação de muitas espécies ocorrentes neste bioma com efeito terapêutico comprovado entre a população economicamente mais carente (ALMEIDA; ALBURQUERQUE, 2002). Isto tem resultado na investigação dos princípios ativos pelas universidades, centro de pesquisas e indústrias farmacêuticas (OLIVEIRA et al.; 2012).

1.3 Família Combretaceae

A família Combretaceae abrange aproximadamente 70 gêneros e cerca de 600 espécies difundidas nas regiões tropicais e subtropicais. Estas espécies possuem características evolutivas avançadas, ocorrendo em diversos biomas, incluindo os ambientes especiais, como mangues e

regiões áridas, encontradas principalmente em diversas partes da África, sendo comumente utilizadas com propósitos medicinais. Os principais usos dessas plantas são para o tratamento de doenças infecciosas como diarreia, gripe, sífilis e gonorréia, febre, dores musculares, hipertensão e edema (BARROSO, 1991; MCGAW et al., 2001; PIETROVSKI, 2006; FYHRQUIST, 2007).

Os maiores gêneros desta família são: *Combretum*, *Terminalia* e *Quisqualis* (ELOFF, 2008). No Brasil, estima-se a ocorrência de 62 espécies, subordinadas a 4 gêneros, essa família ocorre cinco gêneros nativos (*Buchenavia*, *Crombretum*, *Conocarpus* e *Terminalia*) (SOUZA; LORENZI, 2005; MARQUETE; VALENTE, 2006). Nas Américas, estas espécies destacam-se pelas atividades anti-inflamatória, anti-helmíntica, anti-esquitosomal, antimicrobiana, antiviral, antifúngica, no combate a diarreia e a hipertensão, além de anti-tumoral contra linhagem de células modificadas de mama, ovário, próstata, tecido ósseo (PETTIT et al. 1996; MCGAW et al., 2001; SALEEM et al., 2002; FYHRQUIST et al., 2002; CIRLA; MANN, 2003; BESSONG et al., 2005; CHEN; LI, 2006; FYHRQUIST et al., 2006; MAREGESI et al., 2008).

Pesquisas envolvendo espécies do gênero *Buchenavia* vêm aumentando e já proporcionaram o isolamento e identificação de diversos compostos com propriedades biológicas conhecidas, como taninos, flavonóides, terpenos, triterpenos, carboidratos, entre outros. Esses compostos são, provavelmente, os responsáveis pelas diversas propriedades biológicas comprovadas em pesquisas. Estudos recentes envolvendo espécies do gênero *Buchenavia* têm evidenciado propriedades antimicrobianas e antioxidantes referentes aos extratos e também aos compostos isolados (OLIVEIRA et al. 2012; CAMARGO; SUFFREDINI, 2014).

1.4 *Buchenavia tetraphylla*

Buchenavia tetraphylla R.A. Howard (COMBRETACEAE: COMBRETOIDEAE) popularmente conhecida no Brasil como tanimbuca, pertencente a família Combretaceae, é uma espécie neotropical, distribuída desde a Ilha de Cuba (América Central) ao estado do Rio de Janeiro, no sudeste brasileiro (América do Sul) (WEAVER, 1991). No nordeste brasileiro, *B. tetraphylla* (FIGURA 2) está relacionada como uma planta etnomedicinal por comunidades tradicionais (AGRA et al. 2007, 2008). Beutler et al. (1992), isolou um alcaloide citotóxico e anti-HIV das folhas da *B. tetraphylla*. Em pesquisa realizada com extrato e frações das folhas desta planta foi comprovada um potencial antimicrobiano contra bactérias e leveduras (OLIVEIRA et al., 2012).

Figura 2. *Buchenavia tetraphylla*



Fonte: <https://www.flickr.com/photos/tags/taxonomy%3Abenomial%3Dbuchenavia+tetraphylla/>

1.5 Aspectos gerais do gênero *Candida*

O gênero *Candida* pertence ao Reino Fungi, grupo Eumycota, filo Deuteromycota, classe Blastomycetes e faz parte da família Criptococcacea (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; WANG et al., 2009; DAS NEVES MIRANDA, L., 2012). *C. albicans*, dentre as 150 espécies deste gênero, é considerada uma das leveduras mais virulentas, seguida da *C. tropicalis*, estão frequentemente envolvidas em candidíases, com prevalência na Europa, Canadá e nas Américas (VELASCO, 2000; SELITRENNIKOF, 2001; LACAZ et al., 2002; CHANG et al., 2003; KUHN et al., 2003; JIN; LIN, 2005; JADHAV; MAHENDRA, 2006; BAGG et al., 2006; DE TORO, M. et al., 2011).

Apresentam como características blastoconídeos globosos, ovóides, gram-positivo, dimórfico (formação de micélio), saprófita, que tem virulência limitada (LACAZ et al., 2002). As espécies de *Candida* podem reproduzir-se por gemulação, dando à célula uma forma oval (característica das leveduras), também chamada de blastóporo ou blastoconídea, ou podem crescer sob a forma filamentosa através da produção de tubos germinativos resultando numa conversão da forma de levedura para um crescimento em forma de micélio, com produção de hifas e pseudo-hifas (CARDOSO, 2004; WILLIAMS et al., 2011).

Espécies do gênero *Candida* são encontradas na microbiota normal humana, como saprófitas em dobras da pele, orofaringe, cavidade bucal, mucosa vaginal e colonizam o trato gastrointestinal. Podendo ser consideradas patogênicas, apresentando pseudo-hifas e hifas verdadeiras (LACAZ et al. 2002; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; (RODRIGUES; MEZZARI; FUENTEFRÍA, 2011).

1.5.1.2 *Candida albicans* como um patógeno

No ambiente hospitalar as infecções hospitalares geram complicações de importante, principalmente em paciente internados com o sistema imunológico comprometido. Dentre estas, destacam-se as infecções causadas por fungos, uma crescente causa de morbidade e mortalidade em hospitais de todo mundo (VIDIGAL; SVIDZNSKI, 2009; NEGRI et al. 2010a). No Brasil, de acordo com a Rede de Estudos Candidemia brasileira, a *C. albicans* foi responsável por 40,9% dos casos de infecção, seguido de *C. tropicalis* (20,9%), *C. parapsilosis* (20,5%) e *C. glabrata* (4,9%) (COLOMBO et al., 2006; PANIZO et al. 2009; NUCCI et al., 2010).

Fungos do gênero *Candida* são oportunistas e alguns fatores predisponentes são necessários para que ocorra a manifestação e proliferação da doença. Dentre estes fatores destacam-se; relações sexuais sem preservativos, gravidez, ingestão de anticoncepcionais com alta dose de estrogênio, diabetes, disfunções da tireóide, obesidade, uso de dispositivos intrauterinos (DIU), má nutrição, anemia, corticoterapia, quimioterapia, infecções crônicas, uso de antibióticos, doenças imunológicas e imunodeficiência (DRAKE; MAIBACH, 1974; SOBEL, 2007; NYIRJESY, 2008). Alguns pesquisadores afirmam ainda que a região geográfica e o clima também podem desencadear a doença, pois ela ocorre com maior incidência em países de clima quente e úmido, condições que são ideais para desenvolvimento do fungo (HOLANDA et al., 2007; KENNEDY; SOBEL, 2010). *C. albicans* é a espécie mais encontradas nas infecções vaginais, sendo um fungo dimórfico, encontrado na forma levedura (FIGURA 3A), constituinte da microbiota normal da pele e mucosas, como a bucal, trato gastrointestinal e vaginal. Frequentemente causa infecções superficiais de pele e mucosas, sendo que no ambiente hospitalar é responsável por uma alta prevalência de infecção invasiva (MAVOR; THEWES; HUBE, 2005).

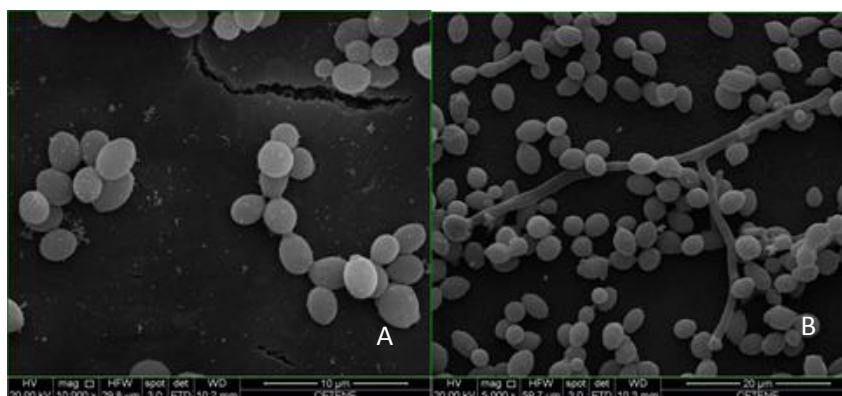
A patogenicidade de um micro-organismo é definida como sua capacidade de determinar doença, que é medida por múltiplos fatores. A transição de um micro-organismo comensal inofensivo a patógeno é atribuível a um extenso repertório de fatores de virulência seletivamente expressos sob adequadas condições predisponentes (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003).

Dentre os fatores de virulência, aqueles mais reconhecidos são a capacidade de aderir a células epiteliais e endoteliais humanas, a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, como as proteinases e fosfolipases, a variabilidade fenotípica e a capacidade de aderir e secretar uma matriz exopolimérica em materiais implantados, bem como nos tecidos de pacientes, originando uma

estrutura denominada de biofilmes (CALDERONE, FONZI, 2001; HASAN et al., 2009; SILVA et al., 2011).

A capacidade em modificar-se nos tecidos, dificultando a ação das células fagocitárias residentes. Após a invasão tecidual, o crescimento do fungo passa a ser predominantemente filamentoso (FIGURA 3B) e surgem, a partir daí, as manifestações clínicas (VAN HUDEN, 1960; KOZINN; TASCHDJIAN; 1962; GOLDSTEIN et al., 1965; REICHL, 1990; GOW et al., 2002; LU et al., 2006; MALIC et al., 2007).

Figura 3. *C. albicans* (A-levedura e B- pseudo-hifas)



1.6 Classificação dos Antifúngicos

Substâncias antimicrobianas ou antibióticas constituem um grupo especial de agentes terapêuticos, geralmente produzidos e obtidos a partir de organismos vivos. Entretanto, são os únicos agentes farmacológicos que não afetam somente aos pacientes que os utilizam, mas também interfere de forma significativa no ambiente hospitalar por alteração da ecologia microbiana (COWAN, 1999; ANVISA, 2007).

Segundo Moreira (2004), essas substâncias diferem de acordo com seu mecanismo de ação, sendo classificados de acordo com seu local de atuação. Logo existem antifúngicos que atuam: inibição da formação da parede celular, ruptura da membrana, disfunção das mitocôndrias, inibição da divisão celular, da síntese de RNA e DNA; da síntese proteica e atuando de forma distinta nas células-alvos (MCCLANAHAN, 2009; WALKER; WHITE, 2011).

1.6.1 Antifúngicos de origem vegetal

As busca por novas substâncias com propriedades antimicrobianas é de suma importância, sendo os produtos de origem natural uma rica fonte de pesquisa (SCHENKEL et. al., 2001).

As plantas produzem um vasto número de substâncias naturais com potencial antimicrobiano e imunomodulador na tentativa de se adaptarem às agressões de meio ambiente. Essas substâncias podem ser isoflavonóides, indóis, fitoesteróis, polissacarídeos, sesquiterpenos, alcaloides, glucanas, taninos, vitaminas e minerais (WILLIAMS, 2001).

Dentre os vários métodos para determinação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais, a mais utilizada é a técnica de microdiluição em caldo. Esta técnica foi descrita inicialmente por Eloff em 1998, para fazer a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), que é a concentração mínima que um extrato ativo de planta pode ter para inibir a proliferação de micro-organismos. Algumas variáveis referentes à determinação da CIM podem ser atribuídas a fatores como: origem da planta e época da sua coleta, condições da planta para a preparação do extrato, micro-organismo utilizado no ensaio, entre outras. Por este motivo, não há um padrão que expresse os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais (FENNEL, et. al., 2004).

Diversos ensaios *in vivo* e *in vitro* vêm comprovando e determinando a ampla variedade das atividades biológicas dos compostos bioativos, como os flavonóides e taninos. Destacam-se, dentre outros, os seguintes efeitos dos flavonóides sobre os sistemas biológicos: capacidade antioxidativa, anti-inflamatória, efeito vasodilatador, anti-tumoral, atuação anti-plaquetária, antimicrobiano, antiviral, auxilia na absorção de vitaminas e atua na cicatrização (HAN, 2007; GORDON; WAREHAM, 2010). Os taninos apresentam ações farmacológicas, como descritas em pesquisa realizada por Machado e Oliveira (2014), destaca-se principalmente por suas atividades antioxidante, antimicrobiana e anti-carcinogênica. Em trabalho realizado por Freiesleben e Jaber (2014), foi observado que os compostos fenólicos apresentaram disfunções nas mitocôndrias, ruptura da membrana, inibição da divisão celular e na formação da parede celular.

1.7 Atividade Sinérgica

Com o aumento da resistência microbiana, as drogas comerciais vêm tornando-se ineficazes contra tratamento para a *C. albicans*, criando um desafio, devido à natureza das células eucarióticas fúngicas, que são semelhantes às células hospedeiras. Poucos agentes antifúngicos estão em uso clínico, e, por conseguinte, a terapia é limitada por considerações de segurança da droga e o seu espectro estreito de atividade, eficácia e resistência. Por causa da falta de novas classes de medicamentos ou alvos moleculares diferentes, combinações de fármacos e produtos naturais

podem ser consideradas uma estratégia para a terapia, tendo em conta a multiplicidade de alvos de fungos contra os quais os agentes atuais são eficazes. Esta abordagem tem implicações financeiras como reformulação de drogas ou combinações existentes pode vir a ser uma opção mais viável, em vez de desenvolver droga que exigirá ensaios clínicos extensos para verificação. Pesquisas têm buscado compreender a estreita relação que pode ser obtida entre substâncias de plantas e antimicrobianos sintéticos (BERENBAUM, 1989; MUKHERJEE et al., 2005; COTTAREL; WIERZBOWSKI, 2007; ARRUDA, 2010; WAGNER, 2011).

Sabe-se que os metabólitos secundários exercem influência sobre a atividade antimicrobiana (TSUCHIYA et al., 1996; COWAN, 1999; ABAD et al., 2012). Assim, para obter-se uma atividade mais expressiva, ganha respaldo o uso de combinações terapêuticas, como a junção de extratos ou frações de plantas com antimicrobianos (SILVA, 2013). A atividade sinérgica pode ter efeito aditivo, que são medicamentos que possuem o mesmo mecanismo de ação, ou efeito de somação, que agem de modos diferentes, ou ainda podem ter efeitos de potencialização, que atuam em diferentes receptores farmacológicos (SECOLI, 2001).

Em caso de sinergismo decorrente da associação entre fármacos antimicrobianos e os ativos vegetais, procede-se com a adoção do índice de concentração inibitória fracionado (ICIF). Este índice corresponde à soma das concentrações inibitórias fracionadas (CIF), as quais consistem na razão entre da concentração inibitória mínima (CIM) dos fármacos combinados e a CIM de cada substância separada (ODDS, 2003; JOHNSON et al., 2004).

Vários estudos recentes têm demonstrado que flavonóides e taninos associados com outros agentes antifúngicos, podem ser utilizados no tratamento alternativo de espécies resistentes as drogas tradicionais (HAN, 2007; RODRIGUEZ-VAQUERO et al., 2007; PARK et al., 2011).

As combinações dos flavonóides com fluconazol demonstram atividade antifúngica contra as espécies resistentes de *C. tropicalis in vitro*. Apesar de alterar a integridade da membrana plasmática e mitocondrial, o sinergismo também parece interagir com o DNA, levando a morte por apoptose, possivelmente devido à acumulação intracelular de ROS (SILVA et al. 2013).

Yamaguchi et al. (2011), mostraram que a Elagitaninos são ricos em taninos e apresentam um grande potencial antimicrobiano quando combinado com drogas comerciais, apresentando mudanças morfológicas na células tratadas pelo ensaio sinérgico.

1.8 Antioxidantes

Antioxidantes são substâncias que podem retardar os processos oxidativos, pois interagem com os radicais livres inibindo a etapa de propagação da reação de oxidação prevenindo a formação de doenças (cancro, cardiovascular, Alzheimer e degeneração macular), contribuindo, dessa

maneira, para uma maior longevidade. Assim, torna-se essencial o equilíbrio entre os radicais livres e o sistema de defesa antioxidante. O organismo possui duas formas de defesa contra os danos causados pelos radicais livres. Uma delas é a utilização de compostos antioxidantes dos alimentos e a outra, um sistema de enzimas celulares como a superóxido dismutase e catalase que protegem o organismo contra os efeitos ruins dos radicais livres (BARREIROS et al., 2006; VARGAS et al., 2008).

O melhor modelo para determinar a capacidade antioxidante de um composto é utilizando células vivas, porém a maioria dos ensaios atuais são baseados na química dos radicais livres e realizados “*in vitro*”. Os métodos mais utilizados em pesquisa de atividade antioxidantes são três, que são o método do difenilpicril-hidrazil (DPPH), o ensaio de azino etilbenzotiazilina-6-sulfonato (ABTS), e o ensaio de TBARS (Substâncias reativas ao ácido Tiobarbitúrico). O método difenilpicril-hidrazil (DPPH) investiga a capacidade de antioxidantes naturais em sequestrar o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil, utilizando espectrofotometria (ROESLER et al., 2007).

Vários trabalhos utilizam o método DPPH como, por exemplo, no estudo de Jandú et al., 2012, que utilizam a referida metodologia para quantificar a eliminação de radicais livres através da ação antioxidante de casca da *Myacrodrupon urundeuva*, provando que está planta da Caatinga é capaz de eliminar radicais livres. Em pesquisa realizada por Zhou et al., 2011, analisaram a atividade antioxidante de extratos de sementes de mamão indicando a presença de compostos antioxidantes.

2. REFERÊNCIA

ABAD, J. M.; BEDOYA, L. M.; APAZA, L.; BERMEJO, P. Anti-Infective Flavonoids: An Overview in Bioactive Natural Products: Opportunities and Challenges in Medicinal Chemistry. Singapura: **World Scientific**. 2012. 443-474 p.

AGRA, M.F., SILVA, K.N., BASÍLIO, I.J.L.D., FREITAS, P.F., BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region northeast of Brazil. **Brazilian jornal of Pharmacognosy**, 18, 472-508. 2008.

AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. 17 Synopsis of the plants know as medicinal and poisonous in northeast of Brazil. **Brazilian journal of pharmacognosy**, P.114-140. 2007.

ALBUQUERQUE, U.P. **A etnobotânica no nordeste brasileiro. in tópicos atuais em botânica.** editado por CAVALCANTI, T. B. E WALTER, B. M. T. Brasília: Embrapa, São Paulo. Sociedade Botânica do Brasil. PP. 241-249. 2000.

ALBUQUERQUE, U.P.; ANDRADE, L.H.C. Uso de plantas em uma comunidade rural no semi-árido do estado de pernambuco, município de alagoinha (nordeste do brasil). **INTERCIÊNCIA**. 26(7): 336-346. 2002

ALBUQUERQUE, U.P.; ANDRADE, L.H.C.; SILVA, A.C.O. Use of plant resources in a seasonal dry Forest (Northeastern Brazil). Brasília: **Acta Botanica Brasilica**.19:27-38. 2005.

ALMEIDA, C.F.C.B.; ALBUQUERQUE, U.P. Uso e conservação de plantas medicinais no estado de Pernambuco: um estudo de caso no agreste. **Interciência**. 26(6): 276-285. 2002.

ALVES, E.O.; MOTA, J. H.; SOARES, T. S.; VIEIRA M. C. Crescimento e distribuição espacial de Croton urucurana Baill em Dourados. **Revista Caatinga**, v.21, n. 1 p.83-88, 2008.

AMOROZO, M.C.M. (2002). Use and diversity of medicinal plants in Santo Antonio do Leverger, MT, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**. 16:189-203.

ANDRADE, C.A.; PEITZ, C.; CÚNICO, M., CARVALHO, J.S.L.; ABRAHÃO, W.M.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D.; KERBER, V. A. Avaliação da atividade antibacteriana e

triagem fitoquímica das flores de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. Ex. G. Don. Leguminosae-Mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 15(1): 13-15. 2005.

ANVISA. 2007. Antimicrobianos - **Base teóricos e uso clínicos**. Disponível: http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/antimicrobianos.htm. Acessado em 13 de jun de 2014.

ARRUDA, A. C. P.; GUSMÃO, N.B.; HONDA, N. K.; SILVA, N. H. **The synergistic activity of antibiotics with *Cladonia substellata* (lichen) compounds against different strains of bacteria**. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia. Universidade Federal de Pernambuco, 2010.

ASSONI, L. C. P.; ALMEIDA, R. M. A. **Teste de aderência de *Candida albicans* em instrumentais odontológicos de aço inoxidável com corrosão e materiais termossensíveis: teste de limpeza/desinfecção química**. Caderno de estudos tecnológicos. V.1, n.1. 2013.

BAGG, J.; MACFARLANE, T. W.; POXTON, J. R.; SMITH, A. J. *Essentials of Microbiology for Dental students*, 2 nd Edition, UK. **Oxford University Press**, 2006.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Quim. Nova**. 29, 113-123. 2006.

BARROSO, G.M. **Sistemática de angiosperma do Brasil: Viçosa**, UFU Editora; vol.2: 1991

BERENBAUM, M. C. What is synergy? **Pharmacological Reviews**, v. 41, n. 2, p. 93-141, 1989.

BESSONG, P. O.; OBI, C. L.; ANDRÉOLA, M.; ROJAS, L. B.; POUYÉGU, L.; IGUMBOR, E.; MEYER, J.J. M.; QUIDEAU, S.; LITVAK, S.. Evaluation of selected south african medicinal plants for inhibitory proprieties against human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and integrase. **Journal of Ethnopharmacology**. v.99, p. 83-91, 2005.

BEUTLER, J.A.; CARDELLINA II., J.H.; MCMAHON, J.B.; BOYD, M.R.; CRAGG, G.M. Anti-HIV and cytotoxic alkaloids from *Buchenavia capitata*. **Journal of Natural Products**, 55, 207-213. 1992.

BIESKI, I.G.C. 2005. **Plantas Medicinais e Aromáticas no Sistema Único de Saúde da Região Sul de Cuiabá-MT**. Secretaria Municipal de Saúde de Cuiabá-Mt. Lavras Minas Gerais – Brasil.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2011. 126p.

BRASIL. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 148p.

BRASIL. **Proposta da política nacional de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos**. 1.ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2001. 40p.

BRASIL. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Departamento de Assistência Farmacêutica**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 60p.

BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas. Contribuição ao desenvolvimento de Novos fármacos e Medicamento**. Primeira edição. Editora Univali, Santa Catarina, 2003.

CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends Microbiol** 9: 327-35, 2001.

CARDOSO, B. C. **Efeito de antifúngicos em suspensões e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis***. Dissertação apresentada ao Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia – Engenharia de Bioprocessos pela Universidade do Minho. 2004.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. A estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, n.1, p.99-105, 1998.

CHANG, H. C.; CHANG, J. J.; HUANG, A. H.; CHANG, T. C. Evaluation of a Capacitance Method for Direct Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts in Positive Blood Cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, 38 (3): 971-976, 2003.

CHEN, P.; LI, J. Chemopreventive effect of punicalagin, a novel tannin component isolated from *Terminalia catappa*, on H-ras-transformed NIH3T3 cells. **Toxicology Letters**. v. 163, p. 44-53, 2006.

CIRLA, A.; MANN, J. Combretastatins: from natural products to drug discovery. **Natural Product Reports**. v. 20, 558-564, 2003.

COLOMBO, A. L. GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36. n. 5, p. 599-607. set/out. 2003.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUER, S.A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D.A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a Nationwide sentinela surveillance of candidemia in eleven medical centers. **J Clin Microbiol**, v.44, n.8, p.2816-23, aug, 2006.

COTTAREL, G.; WIERZBOWSKI, J. combination drugs, na emerging option for antibacterial therapy. **Trends Biotechnol**. 2007; 12: 547-555.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

DAS NEVES MIRANDA, L.; RODRIGUES, E.C.A.; COSTA, S.P.; VAN DER HEIJDEN, I.M.; DANTAS, K.C.; LOBO, R.D.; BASSO, M.; VARKULJA, G.F.; KREBS, V.L.J.; GIBELLI, M.A.B.C.; CRIADO, P.R.; LEVIN, A.S. 2012. *Candida parapsilosis* candidaemia in a neo-natal unit over 7 years: a case seies study. **BMJ Open**2: e000992.

DE TORO, M.; TORRES, M. J.; MAITE, R.; AZNAR, J. Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. **Clin Microbiol Infect**. 2011.

DRAKE, T. E.; MAIBACH, H. I. cutaneous candidiasis. in: robinson jr, h.m. (ed.), the diagnosis and treatment of fungal infections. **Springfield**, 1974, P.5-28.

ELOFF, J.N.; MICGAW, L.J. The biological activity and chemistry of the southem African Combretaceae. **Journal of Ethnopharmacology**. V.119, p.686-699, 2008.

FENNEL, C.W.; LINDSEY, K.L.; MC GAW, L.J.; SPARG, S.G.; STAFFORD, G.I.; ELGORASHI, E.E.; GRACE, O.M.; VAN STADEN, J. Review: Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. **Journal Ethnopharmacology** 94: 205-217. 2004

FORZZA R.C.; STEHMANN, J. R.; NADRUZ, M.; COSTA, A.; CARVALHO JÚNIOR, A. A. et al. **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. 2013. Disponível em:

<<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do>>. Acesso em 29/05/2014.

FRANCISCO, K. S. F. Fitoterapia: Uma opção para o tratamento odontológico. **Revista Saúde**, v.4, n.1, p.18-24, 2010.

FREIESLEBEN, S.H.; JAGER, A.K. Correlation between Plant Secondary Metabolites and Their Antifungal Mechanisms. **Medicinal & aromatic plants**. 2014.

FYHRQUIST, P. **Traditional medicinal uses and biological activities of some plant extracts of African Combretum Loebl., Terminalia L. and Pteleopsis Engl. Species (Combretaceae)**. Dissertação Acadêmica. Universidade de Helsinki, Helsinki, 2007.

FYHRQUIST, P.; MWASUMBI, L.; HAEGGSTRÖM, C. A.; VUORELA, H.; HILTUNEN, R.; VUORELA, P. Ethnobotanical and antimicrobial investigation on some species of Terminalia and Combretum (Combretaceae) growing in Tanzania. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 79, p. 169-177, 2002.

FYHRQUIST, P.; MWASUMBI, L.; VUORELA, P.; VUORELA, H.; HILTUNEN, R. ; MURPHY, C.; ADLERCREUTZ, H. Preliminary antiproliferative effects of some species of Terminalia, Combretum and Pteleopsis collected in Tanzania on some human cancer cell lines. **Fitoterapia**. v.77, p. 358-366, 2006.

GIL, P.R. Wilderness – **Earth's cast wild places**. CEMEX, México, 2002.

GIRALDI, M.; HANAZAKI, N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n.2, p.395-406. 2010.

GIULIETTI, A. M.; NETA, A. L. B.; CASTRO, A. A. J. F.; GAMARRA-ROJAS, C. F. L.; SAMPAIO, E. V. S. B.; VIRGÍNIO, J. F.; QUEIROZ, L. P.; FIGUEIREDO, M. A.; RODAL, M. J. N.; BARBOSA, M. R. V.; HARLEY, R. M. **Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga**. In: SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M.; FONSECA, M.T. Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. 2004.

GIULLIETTI, A. M.; CONCEIÇÃO, A.; QUEIROZ, L. P. Diversidade e caracterização das fanerógamas do semiárido brasileiro. **Recife: Associação Plantas do Nordeste**, P. 488, 2006.

GOLDSTEIN, E.; GRIECO, M. H.; FINKEL, G.; LOURIA, D. D. Studies on the pathogenesis of experimental *Candida parapsilosis* and *guilliermondii* infections in mice. **J Infect Dis.** v.115, p.293-302, 1965.

GORDON, C.N.; WAREHAM, W.D. Antimicrobial activity of the green teapolyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) against clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. **Int. J. Antimicrob. Agents** 36:129–131. 2010.

GORLACH-LIRA, K.; COUTINHO, H.D.M. Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi arid soil of northeastern Brazil. **Brazilian Journal of microbiology**, v. 38, p. 135-141, 2007.

GOW, N.A.; BROWN, A.J.; ODDS, F.C. Fungal morphogenesis and host invasion. **Curr opin microbiol.** 5:366-71, 2002.

HAN, Y. 2007. Synergic anticandidal effect of epigallocatechin-O-gallate combined with amphotericin B in a murine model of disseminated candidiasis and its anticandidal mechanism. **Biol. Pharm. Bull.** 30:1693–1696.

HASAN, F. et al. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. **Microbes Infect.** 11(8-9):753-761, 2009.

HOLANDA, A. A. R. ET AL. Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. **Rev Bras Ginecol Obstet.** v.29, n.1, p.3-9, 2007.

JADHAV, V. J.; MAHENDRA, P. Canine mycotic stomatitis due to *Candida albicans*. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.23, p.233-234, 2006.

JANDÚ, J.J.B.; SILVA, L.C.N.; PEREIRA, A.P.C.; SOUZA, R.M.; SILVA JUNIOR, C. A.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; ARAÚJO, J.M.; CORREIA, M.T.S.; SILVA, M.V. *Myracrodruon urundeuva* bark: an antimicrobial, antioxidant and non-cytotoxic agente. **Journal of Medicinal Plants Research** Vol. 7(8), pp. 413-418, 25 February, 2013.

JIN, Y.; LIN, D. Fungal urinary tract infections in the dog and cat: a retrospective study (2001-2004). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.41, p.373-381, 2005.

JOHNSON, M. D.; MACDOUGALL, C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PERFECT, J. R.; REX, J. H. Combination antifungal therapy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 693-715, 2004.

- JORGE, S. S. A. & MORAIS, R. G. Etnobotânica de plantas medicinais. In: Coelho, M. F. B.; Costa Junior, P.; Dombroski, J. L. D. (Org.) **Diversos olhares em Etnobotânica, Etnoecologia e Plantas Medicinais**. Anais do I Seminário Ma-to Grossense de Etnobiologia e Etnoecologia e II Seminário Centro-Oeste de Plantas Medicinais. Cuiabá: UNICEN. p.89-98. 2003.
- KENNEDY, M. A.; SOBEL, J. D. V ulvovaginal candidiasis caused by non-albicans candida species: new insights. **Curr infect dis rep**. v.12, p.465-470, 2010.
- KOZINN, P. J.; TASCHHDJIAN, C. L. Enteric candidiasis: diagnosis and clinical considerations. **Pediatrics**. v.30, p.71-85, 1962.
- KUHN, D. M.; BALKIS, M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. Uses and limitations of the XTT assay in studies of Candida growth and metabolism. **Journal of Clinical Microbiology**, 41 (1): 506-508, 2003.
- LACAZ, C.S. ; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica**. 9ª. Ed. São Paulo: Sarvier, 2002.
- LEAL, I.R.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. **Ecologia e conservação da Caatinga**. Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, 2003. 804 p.
- LIMA, C. B. N.; BELLETTINI, M. T.; SILVA, A. S.; CHEIRUBIM, A. P.; JANANI, J. K.; VIEIRA, M. A. V.; AMADOR, T. S. Uso de plantas medicinais pela população da zona urbana de Bandeirantes-PR. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n.1, p.600-602, 2007.
- LÓPEZ, C. A. A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, 1(1):19-27. 2006.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. **Nova Odessa**, São Paulo: Instituto Plantarum. 2002.
- LU, Q.; Jayatilake, J.A.M.S; SAMARANAYAKE, L.P.; JIN, L. Hyphal invasion of Candida albicans inhibits the expression. of Human β -defensins in experimental oral candidiasis. **J Invest Dermatol**. 2006; 126:2049-56.
- MACHADO, A. C.; OLIVEIRA, R. C. Medicamentos Fitoterápicos na odontologia: evidências e perspectivas sobre o uso. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.16, n.2, p.283-289, 2014.
- MAHABIR, D.; GULLIFORD, M.G. (1997). Use of medicinal plants for diabetes in Trinidad and Tobago.**Revista Panamericana de Salud Publica**. 1:74-79.

MALIC, S.; HILL, K.E.; RALPHS, J.R., HAYES, A.; THOMAS, D.W.; POTTS, A.J., et al. Characterization of *Candida albicans* infection of na in vitro oral epithelial model using confocal laser scanning microscopy. **Oral microbiol. Immunol.** 2007; 22:188-94.

MAREGESI, S.M.; PIETERS, L.; NGASSAPA, O. D.; APERS, S.; VINGERHOETS, R.; COS, P.; BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Screening of some Tanzanian medicinal plants from Bunda district for antibacterial, antifungal and antiviral activities. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 119, p. 58-66, 2008.

MARQUETE, N.F.S.; VALENTE, N. M. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Combretaceae. **Rodriguésia**. V.56, p. 131-140, 2006.

MAVOR, A. L.; THEWES, S.; HUBE, B. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence atributes. **Curr drug Targets** 6: 863-74, 2005.

MCCLANAHAN, C. Antifungals. **Biofiles**. 2009.

MCGAW, L. J.; RABE, T.; SPARG, S. G.; JÄGER, A. K.; ELOFF, J. N.; STANDEN, J. Van. An investigation on the biological activity of Combretum species. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 75, p. 45-50, 2001.

MCGAW, L.J.; RABE, T.; SPARG, S.G.; JÄGER, A.K.; ELOFF, J.N.; VAN STADEN, J. An investigation on the biological activity of Combretum species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, p. 45-50, 2001.

MMA-IBAMA. MONITORAMENTO DO BIOMA CAATINGA 2002 a 2008. Monitoramento do Desmatamento nos Biomas Brasileiros por Satélite. Acordo de Cooperação Técnica MMA/IBAMA. Centro de Sensoriamento Remoto do Ibama - CSR, Agência Brasileira de Cooperação - ABC e Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento - PNUD, **Relatório Técnico**, p.1-58, 2010.

MONTES, L. V.; BROSEGHINI, L. P.; ANDREATTA, F. S.; SANT'ANNA, M. E. S.; NEVES, V. M.; SILVA, A. G. Evidências para o uso do óleo-resina de copaíba na cicatrização de ferida – uma revisão sistemática. **Natureza on line**, v.7, n.2, p.61-67, 2009.

MOREIRA, L. B. Princípios para uso racional de antimicrobianos. **Rev AMRIGS** 48: 118-120. 2004

- MUKHERJEE, P.K.; SHEEHAN, D.J.; HITCHCOCK, C.A.; GHANNOUM, M.A. Combination treatment of invasive fungal infections. **Clin. Microbiol. Rev.** 18, 163-194. 2005.
- NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S. J.; HUBE, B. Candida albicans Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 67(3): 400-428, 2003.
- NEGRI, M.; MARTINS, M.; HENRIQUES, M.; SVIDZINSK, T.I.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. 2010a. Examination of potential virulence factors of Candida tropicalis clinical isolates from hospitalized patients. **Mycopathologia** 169:175-82.
- NEVES, J. M.; CUNHA, S. **Plantas Medicinais**. Disponível em: <http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/528/1/50-57FCS2006-5.pdf>. Acesso em: 24 de Abril. 2014.
- NYIRJESY, P. Vulvovaginal candidiasis and bacterial vaginosis. **Infect Dis Clin n am.** v.22, p.637-652, 2008.
- NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBÓN, A. M.; RESTREPO, A.; COLOMBO, A. L. (2010). Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clin Infect Dis** 51, 561–570.
- ODDS, F. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1-1, 2003.
- OLIVEIRA, F.Q.; GOBIRA, B.; GUIMARÃES, M.; BATISTA, J.; BARRETO, M.; SOUZA, M. Espécies vegetais indicadas na Odontologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 466-476, 2007.
- OLIVEIRA, Y. L. C.; SILVA, L. C. N.; SILVA, A. G.; MACEDO, A. J.; ARAÚJO, J. M.; CORREIA, M. T. S.; SILVA, M. V. Antimicrobial Activity and Phytochemical Screening of Buchenavia tetraphylla (Aubl.) R. A. Howard(Combretaceae: Combretoideae). **The Scientific World Journal**. Volume 2012.
- PANIZO, M.M.; REVIKINA, V.; DOLANDE, M.; SELGRAD, S. 2009. Candida spp. in vitro susceptibility profile to four antifungal agents. Resistance surveillance study in Venezuelan strains. **MedMycol** 47:137–43

PARK, B.J.; PARK, J.C.; TAGUCHI, H.; FUKUSHIMAE, K.; HYONF, S.H.; TAKATORI, K. *In vitro* antifungal activity of epigallocatechin 3-O-gallate against clinical isolates of dermatophytes. **Yonsei Med. J.** 52:535–538. 2011.

PAVLOVIC', V.; STOJANOVIC', I.; JADRANIN, M.; VAJS, V.; DJORDJEVIC', I.; SMELCEROVIC', A.; STOJANOVIC' , G. Effect of four lichen acids isolated from *Hypogymnia physodes* on viability of rat thymocytes. **Food and Chemical Toxicology**. 2012.

PETTIT, G. R.; HOARD, M.; DOUBECK, D.; SCHMIDT, J.; PETTIT, R.; TACKETT, L.; CHAPUIS, J. Antineoplastic agents 338. The cancer cell growth inhibitory constituents of *Terminalia arjuna* (Combretaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 53, p. 57-63, 1996.

PIETROVSKI, E. F.; ROSA, K.A.; FACUNDO, V.A.; RIOS, K.; MARQUES, M.C.A; SANTOS, A.R.S. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3 β , 6 β , 16 β - trihidroxilup-20(29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* in mice. **Pharmacology biochemistry and behavior**. V.83, p.90-99, 2006.

PRADO, D. E. As caatingas da América do Sul. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. **Ecologia e conservação da caatinga**. Recife: Editora Universitária da Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

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

RAVEN, P. H., EVERT, R. F., CURTIS, H. **Biologia Vegetal**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 906 p. 2007.

REICHI, R.B. Oral Candidiasis: na old disease of growing concern. **Gen dente**. 1990; 38:114-20.

RESINUS. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. 2009. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2014.

RIZZINI, C.T. **Tratado de fitogeografia do Brasil**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural. Edições Ltda., p.157, 1997.

RODRIGUES, D.; MEZZARI, A.; FUENTEFRIA, A. M. Candidúria: Revisão atual. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v.24, n.2. 2011

RODRIGUES, E.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S.; FIORI-TUTIDA, A. C. G. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de gengibre e

eucalipto *in vitro* e em fibras de bananeira infectadas com *Helminthosporium* sp. **Acta Scientiarum**, v. 28, n. 1, p.123-127, 2006.

RODRIGUEZ-VAQUERO, M.J.; ALBERTO, M.R.; MANC-DE-NADRA, M.C. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. **Food Control**. 18:93–101. 2007.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B., SOUSA, C.A.S.; PASTORE, G.M., 2007. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciênc. Tecnol. Aliment** 27 (1), 53-60.

SALEEM, A.; HUSHEEM, M.; HÄRKÖNEN, P.; PIHLAJA, K. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* retz. fruit. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 81, p. 327-336, 2002.

SAMPAIO, E.V.S.B.; GIUIIETTI, A.M.; VÍRGÍNIO, J.; GAMARRA-ROJAS, C.F.L. Vegetação e flora da caatinga. **Recife: Associação Plantas do Nordeste**. p. 176. 2002.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões, Cláudia M. O (org) et al. Farmacognosia da planta ao medicamento. 3. ed. rev. **Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC**, 2001. cap. 15.

SECOLI, S.R. Interações medicamentosas: fundamento para prática clinica da enfermagem. **Revista da Escola de Enfermagem**, v. 35, n.1, p. 28-34. 2001.

SELITRENNIKOFF, C. P. Antifungal Proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, 67 (7): 2883-2894, 2001.

SHER, A. Antimicrobial activity of Natural products from Medicinal Plants. *Gomal Journal of Medical Sciencies*, v.7, n.1 p.72-78, 2009.

SILVA, S. M. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana de espécies vegetais do bioma cerrado**. Dissertação de mestrado da pós-graduação em ciências farmacêuticas. Universidade de Brasília. 2013.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida papansilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiol Rev**. 2011.

SILVELLO, Camila Leidens Corrêa. **O uso de plantas medicinais e de fitoterápicos no SUS: uma revisão bibliográfica**. Monografia (Graduação em Enfermagem) - Escola de enfermagem, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2010.

SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidiasis. **Lancet**. v.369, p.1961-1971, 2007

SOUZA, V.C.; LORENZI, H.; Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira. Baseado em APGII, **Nova Odessa S.P**, Instituto Plantarum, p.465, 2005.

TSUCHIYA, H.; SATO, M.; MIYAZAKI, T.; FUJIWARA, S.; TANIGAKI, S.; OHYAMA, M.; TANAKA, T.; IINUMA, M. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 50, n. 1, p. 27-34, 1996.

VAN HUDEN, V. The occurrence of *Candida* and the other yeasts in the intestinal tracts of animals. **Ann N Y Acad Sci**. v.89, p.59-68, 1960.

VARGAS, P.N.; HOELZEL, S.C.; ROSA, C.S. Determinação do teor de polifenóis totais e atividade antioxidante em sucos de uva comerciais. **.Alimentos e Nutrição**. 19: 11-15, 2008.

VELASCO, M. C. Candidiasis and Cryptococcosis in birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v.9, n.2, p.75-81, 2000.

VIDIGAL, P.G.; SVIDZINSKI, T.I.E. Leveduras no trato urinário e respiratório: infecção fúngica ou não? **J Bras Patol Med Lab**. Maringá, Paraná, V.45, n1m p.55-64, fev. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v45n1/09.pdf>. Acesso em: 08 jun. 2014.

VIDIGAL, P.G.; SVIDZINSKI, T.I.E. Leveduras no trato urinário e respiratório: Infecção fúngica ou não? **J Bras Patol Med Lab**. Maringá, Paraná, v.45, n.1, p.55-64, fev.2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v45n1/09.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2014.

WAGNER, H. Synergy Research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Fitoterapia**, V. 82, N. 1, P. 34-37, 2011.

WALKER, G.; WHITE, N. (2011) Introduction to Fungal Physiology. In: *Fungi: Biology and Applications*, Kavanagh K (ed) John Wiley and Sons, Ltd, UK.

WEAVER, P.L. *Buchenavia tetraphylla* (Vahl.) (Eichler: *Granadillo*). **New Orleans: SO-ITF-SM-43**, Department of Agriculture, Southern Forest Experiment Station, 1991.

WILLIAMS, J.E. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the Peruvian rainforest with a particular emphasis on Unã de gato na sangue de gadro. **Altern. Med. Ver.**, 6(6), 567-579. 2001.

WILLIAMS, D.W.; KURIYAMA, T.; SILVA, S.; MALIC, S.; LEWIS, M.A.O. Candida biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. **Periodontol 2000**. 2011. Feb;55(1):250-65.

YAMAGUCHI, M. U.; GARCIA, F.P.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, T. U. DIAS FILHO, B. P.; NAKAMUR, C. V. Antifungal effects of Ellagitannin isolated from leaves of *Ocotea odorifera* (Lauraceae). **Antonie van Leeuwenhoek**. 99:507–514. 2011.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna. Chapecó, **Argos**. 120p. 2001.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Breve Análise Histórica da Química de Plantas Medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna. Chapecó: **Argos**, 2001.

ZHOU, K.; WANG, H.; MEI, W.; LI, X.; LUO, Y.; DAI, H.; 2011. Antioxidant activity of papaya seed extracts. **Molecules** 16, 6179-6192.

CAPÍTULO 2

1. ARTIGO

Atividade anti-*Candida* e citotóxica dos extratos de *Buchenavia tetraphylla* (AUBL.)

R.A. Howard (Combretaceae: Combretoideae)

Atividade anti-*Candida* e citotóxica dos extratos de *Buchenavia tetraphylla* (AUBL.)**R.A. Howard**Cavalcanti Filho, J. R. N.¹¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, UFPE, PE, Brasil.

RESUMO: O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de extratos orgânicos de folhas de *Buchenavia tetraphylla* frente a *Candida albicans*, além de analisar o potencial citotóxico e antioxidante do extrato mais ativo. A triagem fitoquímica foi realizada por cromatografia em camada delgada, onde foram observada a presença de hidrocarbonetos, açúcares, glicosídeos, terpenos, taninos e flavonóides. A atividade antimicrobiana, foi determinada pelo método de microdiluição em caldo utilizando 10 linhagens de *C. albicans*. Os valores de CMI dos extratos variaram a partir de 0,15625 mg/mL a 2,5 mg/mL. Como o extrato metanólico apresentou melhor resultado anti-*C. albicans*, sua ação combinada com fluconazol foi testada sendo observado efeitos aditivos e sinérgicos. Nas células tratadas com o extrato metanólico no valor do CMI foram observadas modificações externas, apresentando maiores rachaduras e encolhimento celular que podem ser atribuído à perda do volume citosólico. Em relação a atividade hemolítica do mesmo extrato testado acima, foi observado um IC₅₀ igual a 3,935 ± 0,3088 mg/mL e para atividade antioxidante um IC₅₀ de 64,66 (± 1,81 µg/mL). Assim, estes resultados estimulam novas pesquisas sobre aspectos farmacológicos e citotóxicos dos extratos de *B. tetraphylla* a fim de apoiar a sua aplicação como agente antimicrobiano.

Palavras-chave: Recursos naturais, Caatinga, Combracetaceae, atividade antifúngicos.

ABSTRACT: The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of leaves extracts from *Buchenavia tetraphylla* against *Candida albicans* and the cytotoxic and antioxidant action of the most active extract. The phytochemical screening was performed by thin layer chromatography where the presence of hydrocarbons, sugars, glycosides, terpenes, tannins and flavonoids were detected. The antimicrobial activity was determined by the broth microdilution method using 10 strains of *C. albicans*. The MIC values of the extract ranging from 0.15625 mg/mL to 2.5 mg/mL. As the methanolic extract showed the best anti-*C. albicans* inhibition, its combined action with fluconazole was also tested and additive and synergistic effects were observed. In cells treated with methanolic extract at MIC value were observed external modifications, such as higher cracking and shrinking of cells which may be due to loss of cytosolic volume. Regarding the hemolytic and antioxidant activities, IC₅₀ values of 3.935±0.3088 mg/mL and 64.66±1.81 mg/mL were observed. Therefore, these results stimulate new research on pharmacological aspects, isolation and chemical characterization of compounds from *B. tetraphylla* leavess in order to support its application as an antimicrobial agent.

Keywords: Natural resources, Caatinga, Combracetaceae, antifungal activity.

1. INTRODUÇÃO

A frequência de infecções invasivas devido a fungos patógenos oportunistas aumentou claramente nos últimos anos (PFALLER; DIEKEMA, 2010). *Candida albicans* é um fungo patogênico oportunista cuja capacidade para se tornar virulento depende da imunidade do hospedeiro (YANG, 2003). Dentre as leveduras do gênero, *C. albicans* é a mais comum e responsável por cerca de metade dos casos de infecção, seguindo-se *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei* (PFALLER; DIEKEMA, 2007; SHAO et al., 2007).

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas há muito tempo com finalidade terapêutica, em suas diferentes formas farmacêuticas, utilizando os compostos ativos isolados, no tratamento e prevenção de doenças (BRASIL, 2006b; DI STASI, 2007; CARVALHO; SILVEIRA, 2010). No Nordeste brasileiro, algumas plantas da Caatinga (bioma exclusivo do Brasil) têm sido utilizadas pela população local devido suas propriedades medicinais. Tais plantas ainda demonstram a capacidade de produzir compostos bioativos que atuam no tratamento de doenças causadas por bactérias e fungos (MONTEIRO et al., 2006; DA SILVA et al, 2011; TRENTIN et al, 2011).

Buchenavia tetraphylla (Aubl.) R. A. Howard (Combretaceae: Combretaceae) é uma espécie de planta neotropical que encontra-se distribuída desde a ilha de Cuba (América Central) ao estado do Rio de Janeiro, no sudeste brasileiro (América do Sul) (WEAVER, 1991). No Brasil, esta planta é popularmente conhecida como “tanimbuca” e está relacionada como uma planta etnomedicinal por comunidades tradicionais na região do Nordeste brasileiro (AGRA et al. 2007a, 2008). AGRA et al.(2007) relatam que as plantas da família Combretaceae tem sido cada vez mais utilizadas em tratamentos medicinais que incluem anti-helmínticos, enterite aguda, colite, prisão de ventre, cárie dentária, diurético, inflamações em geral, malária, tuberculose e câncer, entre outros. Em um estudo recente foi demonstrado que extratos e frações de folhas de *B. tetraphylla* possuem um amplo espectro de ação, inibindo tanto bactérias Gram positivos e negativas, como fungos, dentre eles *C. albicans* (OLIVEIRA et al., 2012).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos de *B. tetraphylla* contra isolados clínicos de *C. albicans*, avaliando o sinergismo com fluconazol e alterações ultra-estruturais induzidas pelo extrato mais ativo. Adicionalmente foi realizada a triagem fitoquímica, citotoxicidade e atividade antioxidante do extrato bioativo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta e Armazenamento da planta

Amostras das folhas, ramos, flores e frutos de *Buchenavia tetraphylla* foram coletados em novembro de 2013, no Parque Nacional do Catimbau (Pernambuco, Brasil), processadas conforme as técnicas taxonômicas, identificada pelo Dr. Alexandre G. Silva (Instituto Nacional do Semiárido) e depositadas no Herbário IPA, do Instituto Agrônomo de Pernambuco. Os diferentes tecidos de *B. tetraphylla* foram submetidos à secagem em temperatura ambiente e em seguida, moído para padronização do tamanho de partículas do pó da planta através de moinho de facas Macsalab mil (Model 200 LAB). Este material foi armazenado em um recipiente fechado e escuro até ser utilizado.

2.2 Obtenção do óleo essencial

Os tecidos de *B. tetraphylla*, foram submetidos ao método de hidrodestilação, empregando extrator descrito na farmacopéia Brasileira, durante 5h, 100 g do pó da planta para água.

2.3 Obtenção do extrato

O material obtido (25g) foi misturado com hexano (100 mL) e submetido à agitação constante em mesa agitadora com rotação de 125 rpm, durante 72 horas em temperatura de 25°C. Em seguida, o extrato foi filtrado e o sobrenadante foi evaporado rotativo, o resíduo foi misturado em 100 mL de cada um dos seguintes solventes em ordem sequencial: clorofórmio, acetato de etila e metanol. O resíduo de cada solvente foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenado (4°C).

2.4 Análise em cromatografias em camada delgada

Os extratos de *B. tetraphylla* foram submetidos a análises por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em placas de sílica gel Merck F₂₅₄₊₃₆₆, utilizando as fases móveis 551 (Sulfato cálcico) e 532 (cloreto férrico). Para a revelação do cromatograma foram utilizados os seguintes reagentes: sulfato cálcico e cloreto férrico. Os compostos foram identificados através da comparação de seus R_fs e com os reveladores específicos para os metabólitos.

2.5 Obtenção e perfil de resistência das linhagens utilizadas

Foram utilizados, para as atividades antimicrobianas os extratos hexano, acetato de etila, clorofórmio e metanol da *B. tetraphylla*, e o micro-organismo padrão *Candida albicans* (UFPEDA1007) pertencentes à coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA) e linhagens clínicas recentes, obtidas através de solicitações a diversos Laboratórios de Análises Clínicas. A manutenção das linhagens foi realizada no meio Sabouraud dextrose ágar.

Para determinação do perfil de resistência, as linhagens clínicas foram cultivadas em meio Sabouraud dextrose ágar a 30°C por 18 horas. Em seguida, as leveduras foram inoculadas em placas de Petri com Sabouraud dextrose Agar e colocadas em contato com discos de antibióticos e antifúngicos comercializados. As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas, após a incubação, os halos de inibição (IDZs) foram analisados.

2.6 Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima microbiota (CMM)

CIM foi determinada pelo método de microdiluição (CLSI, 2011). A diluição em série do extrato/fracções foi preparado em Sabouraud caldo, 10 µL (cerca de $1,5 \times 10^8$ CFU/mL) de suspensão de leveduras foi adicionado. As amostras foram incubadas durante 24 h a 30°C. Solução Resazurina (0,01%) foi utilizada como um indicador no crescimento. Foram utilizados controles positivos para o DMSO e para o micro-organismo, e controle negativo. O CIM foi determinado na concentração que não houve crescimento da levedura e não ocorreu mudança na coloração. Posteriormente, as culturas foram semeadas em meio de Sabouraud Agar, e incubadas durante 24 h a 37°C para determinar o CMM que corresponde à concentração mínima de extrato/fracções que eliminaram as Leveduras.

2.7 Atividade sinérgica

O método Checkerboard foi usado para testar o efeito combinatório do Extrato metanólico de *B. tetraphylla* e fluconazol contra as cepas de *C. albicans* (UFPEDA1007, F01, F02, F03, F08, F11, F14, F22, F23 e F27). O extrato e a droga foram adicionadas ao meio para dar uma concentração final de 5 e 0,05 mg/mL, respectivamente, e uma diluição em série foi preparada (5 a

0,00976563 mg/mL a Extrato metanólico e 0,05 a 0,00009766 mg/mL a droga). A interação foi avaliada por determinação algebricamente fracionários índices de concentração inibitória (Σ CIF) de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Índice CIF } (\Sigma\text{CIF}) = \text{CMI E/D} : \text{CMI E} + \text{CMI D/E} : \text{CMI D}$$

CIME (concentração mínima inibitória do extrato) e CIMD (concentração mínima inibitória da droga): CMI extrato/fluconazol; CMIE/D: CMIE em combinação com a fluconazol; CMID/E: é o CMI de fluconazol em combinação com o extrato;

A interpretação dos dados: $\Sigma\text{CIF} \leq 0.5$: sinergismo (syn); $0,5 < \Sigma\text{CIF} \leq 1$: Aditivo; $1 < \Sigma\text{CIF} < 4$: sem interação; $\Sigma\text{CIF} \geq 4$: antagonismo (VUUREN e VILJOEN, 2011).

2.8 Atividade Hemolítica

A atividade foi realizada seguindo a metodologia de Oliveira et al.(2012). Onde o sangue (5-10 mL) foi obtido a partir voluntários saudáveis, não-fumantes, por punção venosa, após consentimento informado por escrito. Eritrócitos humanos partir de sangue citratado foram imediatamente isolados por centrifugação a 1500 rpm por 10 min. Após a remoção do plasma, os eritrócitos foram lavados três vezes com tampão fosfato-salina (PBS; pH 7,4) e depois uma suspensão de eritrócitos a 1% foi preparado como mesmo tampão. Uma alíquota de 1,1 mL de suspensão de eritrócitos foi misturada a 0,4 mL do extrato em várias concentrações (0,156 - 2,5 mg/mL). O controle negativo e controle positivo receberam 0,4 mL de DMSO e de Triton X-100, respectivamente. Após 60 minutos de incubação à temperatura ambiente, as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi usado para medir a absorbância da hemoglobina liberada a 540 nm. O valor médio foi calculado a partir dos ensaios em quadruplicata. A atividade hemolítica foi expressa em relação à ação do Triton X-100 e calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Atividade hemolítica (\%)} = [(A_s - A_b) \cdot 100] / (A_c - A_b)$$

Sendo, A_c a absorbância do controle (branco, sem extrato), A_s a absorbância na presença de extrato e A_b sendo referente a absorbância da solução de Triton X-100.

2.9 Atividade antioxidante

Neste ensaio a atividade de radical livre do extrato foi medido em termos de hidrogênio doado usando o DPPH radical estável (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo; Sigma-Aldrich) (BLIOS, 1958). Uma alíquota de 250 μ L de solução de DPPH (1mM) foi misturada com 40 μ L de diferentes

concentrações de extratos (50 - 250 µg/mL). Trinta minutos mais tarde, a absorbância foi medida a 517 nm. O ácido ascórbico foi utilizado como o composto de referência. A sequestradora de radicais livres foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$[\text{DPPH}] (\%) = (\text{Ac} - \text{As}) / \text{Ac} \times 100$$

Onde: Ac = controle de absorção; As = Absorbância da Amostra

2.10 Microscopia de Varredura

Após incubação (12h, 24h a 37°C), as células foram fixadas em tampões específicos (glutaraldeído a 2,5%/4% de paraformaldeído em 0,1 mol/L Tampão fosfato 1, pH 7,2), pós-fixador (1% de ósmio tetroxido/0.8% ferricianeto de potássio/5 mM CaCl₂ 1 em 0,1 mmol/L um tampão de cacodilato), desidratada (série de acetona graduada) e incorporado utilizando um kit de meio de incorporação de epóxi (Fluka, Suíça). Logo após as células aderiu-se sobre uma lamela de poli-L-lisina-revestidas durante 5 min à temperatura ambiente. As células foram desidratadas (etanol graduada), de ponto crítico seco, ligado ao topos de montagem de alumínio, sputter revestido com 20 nmol/L1 ouro e fotografada com uma Quanta 200 F (empresa FEI) (SILVA et al., 2012).

2.11 Análises Estatísticas

Todos os testes foram realizados em quadruplicata. A análise estatística foi realizada pelo teste t-Student com auxílio do software Statistica 8.0. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Os índices de correlação foram calculados utilizando o coeficiente de Pearson (ρ).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Obtenção do óleo essencial

A obtenção do óleo essencial (folha e ramos) foi realizada a partir do método de hidrodestilação o qual não obteve resultado, sendo assim, efetuando a utilização dos extratos de *B. tetraphylla*.

3.2 Análise química por cromatografias em camada delgada

Os resultados fitoquímicos dos extratos de *B. tetraphylla* mostraram a presença de flavonóides, terpenos, tanino, açúcar, hidrocarboreto e glicosídeos como pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1– Resultados da prospecção fitoquímica dos extratos de *B. tetraphylla*

Extratos	Hidrocarboreto	Açúcar	Terpenos	Taninos	Flavonóides
Hexano	+	+	+	-	-
Clorofórmio	-	+	+	-	-
Acetato de etila	-	-	+	+	+
Metanol	-	-	-	+	+

Oliveira et al (2012), demonstraram nos resultados da prospecção fitoquímica da folhas de *B. tetraphylla* a presença de flavonoides, terpenos, proantocianidinas, leucoanthocianidin triterpeno, carboidrato e tanino. Corroborando como as análises químicas realizadas nos extratos polares deste trabalho.

Os metabólitos secundários estão amplamente encontrados no Reino Plantae, por serem presentes na fotossíntese de células. Com isso, estudos anteriores mostraram que a presença destes compostos em plantas medicinais apresentam atividades antibacteriana e antifúngica (MANTHEY, 2001; LIU et al., 2010; SUZGEC-SELCUKA; BIRTEKSOZB, 2011).

3.2 Perfil de resistência das linhagens de *Candida albicans* utilizadas

Foram obtidas 9 linhagens de *C. albicans*, sendo 3 (F01, F03 e F24) sensível aos mesmos antifúngicos (fluconazol, cetaconazol, intraconazol e anfotericina B), F22, F23 e F27 mostraram uma suscetibilidade intermediárias para intraconazol e fluconazol e as 3 cepas (F02, F08 e F11) apresentaram resistências fluconazol e intraconazol). O perfil de resistência das linhagens testados, podem ser visto na Tabela 2.

Tabela 2- Suscetibilidade das linhagens de *C. albicans* aos antifúngicos testados

Linhagem	Anfotericina B	Cetoconazol	Fluconazol	Itraconazol
F01	R	S	S	S
F02	S	S	R	R
F03	S	S	S	S
F08	S	S	R	R
F11	S	S	R	R
F22	S	S	I	I
F23	S	S	I	I
F24	S	S	S	S
F27	S	S	I	I

S= Sensível; R= resistente; I= intermediário

Nota: Valores de interpretação para Anfotericina B: R>10mm, S≤10mm; Cetoconazol: R≤20mm, S≥28mm, I 21-27mm; Flucanazol: R≤14mm, S≥19mm, I 15-18mm; Itraconazol: R≤13mm, S≥23mm; I 15-18mm.

3.3 Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima microbiota (CMM)

Todos os extratos da *B. tetraphylla* apresentaram ação anti - *C. albicans*. Os valores de CMI para a linhagem UFPEDA1007, foram de 0,625 mg/mL, 1,25 mg/mL, 0,15625 mg/mL e 0,625 mg/mL; e CMM de 2,5 mg/mL, >5mg/mL, 5mg/mL e >5 mg/mL, respectivamente para metanol, hexano, clorofórmio e acetato de etila. Para as linhagens clínicas o extrato metanólico da *B. tetraphylla* obteve CMI variando de 0,625 mg/mL a 1,25 mg/mL e CMM de 1,25 mg/mL a 2,5mg/mL (Tabela 3). As linhagens testadas, apresentaram sensibilidade a fração metanólica, a uma concentração, destes 80% eram sensível a 0,625 mg/mL. Para CMM, apenas 5 linhagens foram sensíveis a uma concentração menor que 2,5 mg/mL. Assim, o CMI₅₀ para o extrato metanólico é de 0,625 mg/mL.

Os valores da CMI do extrato hexânico variaram de 0,15625 mg/mL a 2,5mg/mL, e os de CMM de 1,25 mg/mL a >5 mg/mL. Para o extrato clorofórmico observou-se uma variação de 0,15625 mg/mL a 1,25 mg/mL (CMI) e de 0,3125 mg/mL a 5 mg/mL (CMM). Por fim, o extrato de acetato de etila no extrato o CMI foi de 0,625 mg/mL a 2,5mg/mL e CMM de 1,25 mg/mL a >

5mg/mL. Os valores do CMI₅₀ são 0,625 mg/mL; 1,25 mg/mL e 1,25 mg/mL, para os extratos clorofórmico, hexânico e acetato de etila, respectivamente.

Utilizando o Coeficiente de Correlação de Pearson (ρ) foi possível observar uma correlação moderada negativa entre os valores de CMI e CMM do extrato metanólico com índices de Múltipla Resistência à antibióticos (MAR; Multiple antibiotic resistance) ($\rho = -0,45$ para a correlação CMI / MAR e $\rho = -0,46$ para a correlação CMM / MAR). Adicionalmente, foram encontradas correlações moderadas para CMI/ MAR para os extratos acetato de etila ($\rho = -0,30$) e clorofórmico ($\rho = 0,461$). O extrato hexânico apresentou uma correlação fraca ($\rho = -0,28$ para a correlação CMI / MAR). Sugerindo que a ação dos extratos da *B. tetraphylla* (metanólico, acetato de etila e hexânico) foram mais ativos para as linhagens com mais resistências. O extrato clorofórmico apresentou uma correlação moderada com o perfil de resistência das linhagens estudadas.

Tabela 3- Atividade antimicrobiana de *B. tetraphylla* dos extratos de frações polares.

<i>C. albicans</i>	Acetato de Etila				Clorofórmio			Hexano			Metanol		
	MARS	CMI ¹	CMM ¹	CMM/CMI	CMI	CMM	CMM/CMI	CMI	CMM	CMM/CMI	CMI	CMM	CMM/ CMI
F01 ²	0,25	1,25	>5	>4	0,625	5	8	0,625	1,25	2	0,625	1,25	2
F02 ²	0,5	1,25	5	4	1,25	2,5	2	2,5	5	2	0,625	2,5	4
F03 ²	0	2,5	>5	>5	0,625	2,5	4	0,625	2,5	4	1,25	2,5	2
F08 ²	0,5	0,625	>5	>8	0,625	1,25	2	1,25	5	4	0,625	1,25	2
F11 ²	0,5	1,25	2,5	2	0,625	1,25	2	0,15625	1,25	8	0,625	1,25	2
F22 ²	0	1,25	5	4	0,625	2,5	4	1,25	2,5	2	0,625	2,5	4
F24 ²	0	0,625	5	8	0,625	1,25	2	0,625	>5	>8	0,625	1,25	2
F23 ²	0	2,5	5	2	0,625	1,25	2	1,25	2,5	2	1,25	2,5	2
F27 ²	0	0,625	1,25	2	0,625	1,25	2	1,25	2,5	2	0,625	2,5	4
1007	0	0,625	2,5	4	0,15625	0,3125	2	1,25	5	4	0,625	1,25	2

¹CIM e CMM das amostras foram expressos em mg / ml (CLSI, 2011). ²Fonte de *C. albicans*: secreção vaginal.

Em estudos realizados por Oliveira et al. (2012), com o extrato hidroalcoólico/frações de *B. tetrphylla* contra a *C. albicans* (UFPEDA1007), foram observado a CMI de 12,5 mg/mL e uma CMM >25 mg/mL para o extrato bruto; e a CMI de 12,5 mg/mL e uma CMM 25 mg/mL para as frações. Mostrando que os resultados obtidos por Oliveira e colaboradores diferem do presente estudo, devido a solventes utilizados na extração. Ratificando que a espécie possui uma boa diversidade de componentes bioativos.

Dos quatros extratos testados o metanólico foi o mais ativo para a maioria das cepas, apresentando um maior potencial microbida (Relação CMB/CMI entre 2 e 4), seguido pelo extrato clorofórmio. De acordo com a relação de MMC/MIC todos extratos e as frações que podem ser classificadas como agentes microbicidas ($MMC/MIC \leq 4$) (PANKEY; SABATH, 2004).

No extrato metanólico foram observados a presença de compostos, tais como, flavonóides e taninos; não sendo encontrado no extrato clorofórmico. Em outros estudos, também confirmaram na análise preliminar qualitativa o papel que os flavonóides desempenham na biologia vegetal, que é, por vezes, aproveitado para explorar suas atividades terapêuticas como, por exemplo, antifúngica e bactericida; antioxidantes e protetora dos raios ultravioleta (VIOLANTE et al., 2009). Os taninos são compostos que possuem a habilidade de formar complexos com proteínas que são insolúveis em água. O efeito antimicrobiano dos compostos pertencentes a este grupo, já foi comprovada em inúmeros estudos relacionados a diferentes bactérias e fungos (MONTEIRO et al., 2005).

Extratos ricos em flavanóides são reconhecidos como bons agentes contra *C. albicans*, como demonstrado por Yousefbeyk e colaboradores (2014) no extrato metanólico dos frutos da *Daucus littoralis*, onde foram obtidos valores de CMI e CMM respectivamente 7,8 mg/mL e 15,6 mg/mL. Do mesmo modo, Katerere et al. (2012) analisaram três plantas da família Combretaceae, que possuíam flavonoides e uma concentração mínima inibitória de 6,25 µg/mL foi obtido. Flavonóides e taninos também são conhecidos pelas suas atividades antifúngicas, antivirais, antioxidantes, anti-inflamatórias e antibacterianas (CUSHNIE et al., 2005).

3.4 Atividade sinérgica

A combinação entre droga/extrato levou a uma interação das substâncias utilizadas frente à linhagem padrão UFPEDA1007 de *C. albicans* e a linhagem clínica (F27), ocorrendo um efeito aditivo. Para as linhagens clínicas (F01, F02, F03, F08, F11, F14 e F23) ocorreu assim um efeito sinérgico entre a droga/extrato na proporção 1:1 (V/V). Estes resultados podem ser observados na

tabela 4. Estas linhagens apresentaram melhores resultados da CMI para o extrato metanólico, comparando-se com os fármacos comerciais.

Tabela 4- Ensaio sinérgico do Extrato metanólico da *B. tetraphylla* com o antifúngico fluconazol para a linhagem padrão UFPEDA 1007 de *C. albicans* e linhagens clínicas.

<i>C. albicans</i>	CIF	INTERAÇÃO
F01	0,5	SINERGISMO
F02	0,375	SINERGISMO
F03	0,375	SINERGISMO
F08	0,375	SINERGISMO
F11	0,5	SINERGISMO
F14	0,375	SINERGISMO
F22	8	ANTAGONISTA
F23	0,5	SINERGISMO
F27	0,75	ADITIVO
1007	0,75	ADITIVO

$\Sigma\text{CIF} \leq 0.5$: sinergismo (syn); $0,5 < \Sigma\text{CIF} \leq 1$: ADITIVO; $1 < \Sigma\text{CIF} < 4$: sem interação; $\Sigma\text{CIF} \geq 4$: antagonismo

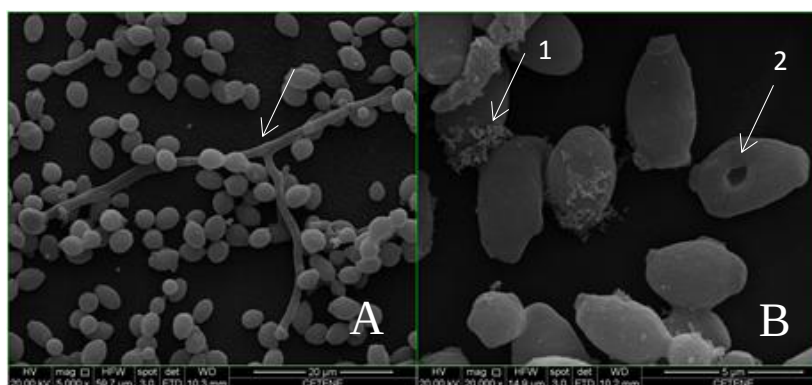
A combinação de produtos naturais e antifúngicos é uma área que está aumentando na pesquisa de fitoterápicos (WAGNER; ULRICH-MERZENCH, 2009; AMBER et al., 2010). A associação entre os compostos derivados de plantas e antifúngicos já foram avaliados anteriormente contra agentes infecciosos, dentro deles leveduras do gênero *Candida*, apresentando como resposta apoptose pela exposição de fosfadilserina na membrana do plasma e as alterações morfológicas, despolarização mitocondrial; e condensação e fragmentação do DNA (SHIN; PYUN, 2004; GIORDANI et al., 2004; HAN, 2007; HEMAISWARYA et al., 2008; COUTINHO et al., 2009a; AMBER et al., 2010; SAAD et al., 2010; SILVA et al., 2014). Assim a combinação entre produtos naturais e drogas comerciais pode ampliar os espectros de ação e a eficácia, permitindo a utilização de concentrações menores de cada droga (ESTRELLA-CUENCA, 2004; NIGHTINGALE et al., 2007).

3.5 Efeito ultraestruturais do extrato metanólico da *B. tetraphylla*

Avaliação da atividade anti-*Candida* do extrato metanólico da *B. tetraphylla*, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelou que nas células do controle de *C. albicans*

após 12 horas de incubação, mostraram formas ovais normais com superfícies lisas e apresentaram pseudo-hifas (figura 1A) que estão presente em células patogênicas. Exibindo papilas polares e cicatrizes do broto. Após o tratamento com o extrato no valor do CIM foi observado modificações externas das células, apresentando maiores rachaduras na parede celular e o encolhimento das células, certamente devido à perda de volume citosólico (figura 1B). Estes resultados mostraram que possivelmente a *C. albicans* tratada com o extrato metanólico da *B. tetraphylla* perde sua patogenicidade. Isto pode ser visto na figura 1, onde as células sem tratamento possuem pseudo-hifas e quando foram tratadas pelo extrato houve inibição da formação desta estrutura.

Figura 1. Efeito do extrato metanólico da *B. tetraphylla* em células de *Candida albicans* (A- sem tratamento; B- tratamento com o extrato; seta 1- rachaduras na parede celular; seta 2- encolhimento das células).



Moreira (2010), mostrou que as células de *C. albicans* quando tratadas com o extrato das folhas de *Plinia cauliflora* demonstraram pequenas alterações morfológicas, com enrugamento das células e uma diminuição no volume de conteúdo celular. A cromatografia em camada delgada realizada por Moreira observou a presença de flavonóides, taninos e terpenos no extrato utilizado.

Em estudos realizados por Yamaguchi et al. (2011), observaram que células tratadas com compostos ricos em taninos apresentavam danos e perda da integridade da parede celular das leveduras. Estes resultados apresentam simetria com os observados nesta pesquisa, obtendo modificações na morfologia celular.

Bruneau et al. (2003), em pesquisa com o antifúngico mulundocandina (inibidor de glucana) observou a mudança morfológica promovendo distorção e encurtamento das células. Sugerindo que a presença de compostos ativos, como, taninos, flavonóides e terpenos, podem estar associado a inibição da produção de glucana e de ergosterol que está presente na membrana das leveduras.

Aplicação do técnica de MEV tem sido recomendada como ferramenta útil para as análises das células fúngicas, por causa da sua alteração morfologia causadas quando entra em contato com compostos bioativos antifúngicos, com flavonóides e taninos (SUSAN; TANYA, 2008).

3.6 Atividades Citotóxicas

3.6.1 Atividade Hemolítica

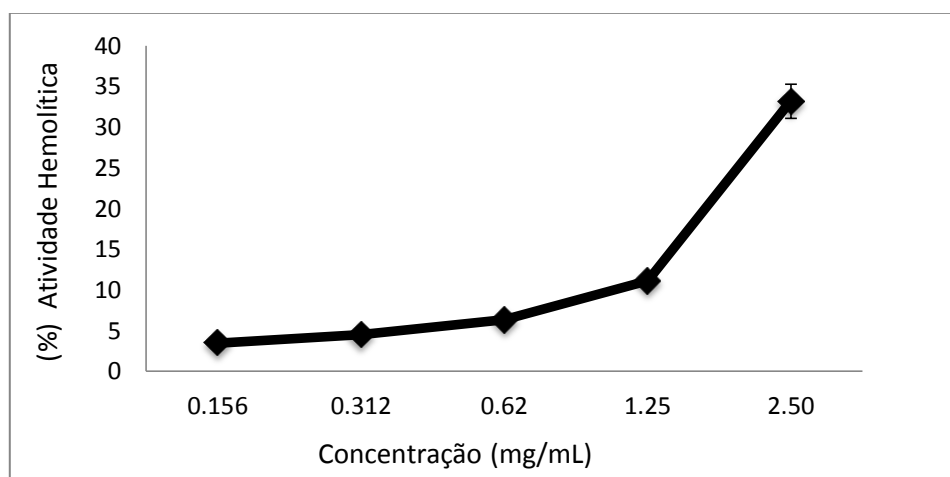
A atividade hemolítica pode ser avaliada por diversas técnicas, consistindo na dissolução de eritrócitos, membranas celulares, aumento da permeabilidade de membranas e lise celular. Estes métodos avaliam a ruptura de membrana e a morte celular, ou seja, consistem na verificação de possíveis danos de substâncias presentes nos extratos sobre as células do sistema hematopoiético em especial os eritrócitos que quando lisados liberam hemoglobina ao meio (MIYAZAKI et al., 2013).

A avaliação citotóxica do extrato metanólico de *B. tetraphylla* foi encontrado mostraram os resultados entre 3,5% até 33,20% nas concentrações 0,156; 0,312; 0,625; 1,25 e 2,5 mg/mL como pode ser observado na figura 2. O extrato mostrou um IC₅₀ de 3,935 ($\pm$ 0,3088) mg/mL. Silva et al. (2013), obtiveram o resultado semelhante, onde o IC₅₀ em mg/mL foi entre 1,91 e 3,92. O IC₅₀ da atividade anti-*C.albicans* do extrato foi seis vezes superior aos valores do CMI. Na atividade hemolítica, a análises estatística mostra que houve diferença significativa a nível $p=0,05$ quando comparado ao controle positivo Triton x-100 com as concentrações do extrato utilizado. Assim, mostra que o extrato utilizado não demonstrou uma alta toxicidade para os eritrócitos humanos.

Em pesquisa realizada por Violante (2008), mostrou a presença do flavonóide nos extratos das plantas investigadas, apresentando uma grande potencial antimicrobiano e baixa citotóxica, permitindo a possibilidade de se encontrar novos e eficazes compostos antimicrobianos. Assim, esta atividade pode ser considerada um parâmetro de citotoxicidade importante que somado a outros critérios de toxicidade podem respaldar a avaliação de segurança do uso de determinada espécie vegetal (OLIVEIRA et al., 2009; JANDÚ et al., 2012).

Sabe-se que muitas plantas medicinais utilizadas pela população na forma de chás e infusões não são suficientemente estudadas quanto à presença de substâncias citotóxicas que podem causar efeitos adversos e consequentemente danos à saúde (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007).

Figura 2. Atividade hemolítica do Extrato metanólico da *B. tetraphylla*.

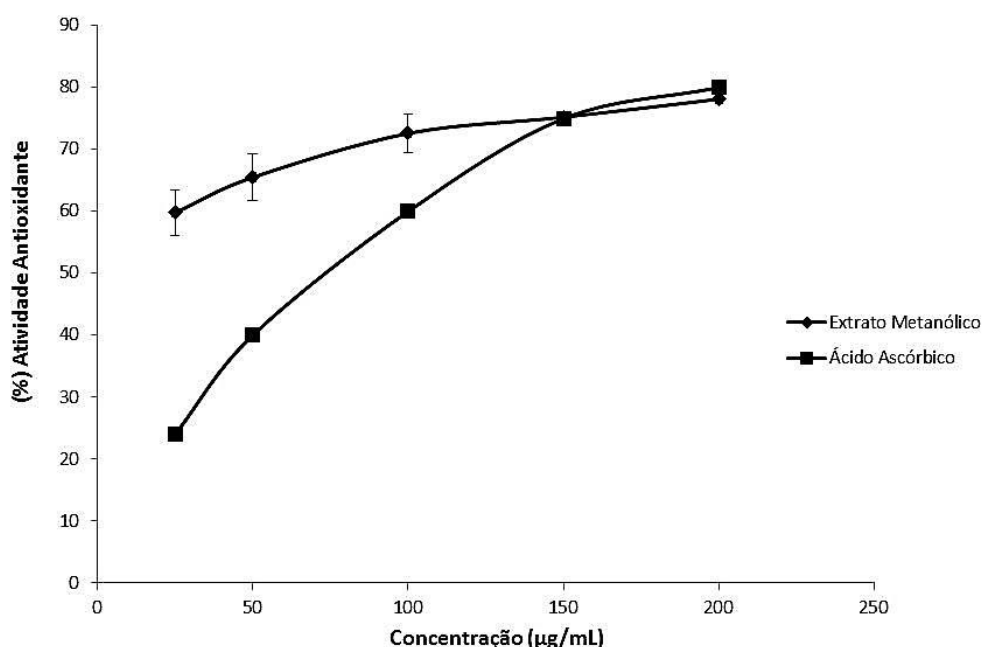


3.6 Atividade Antioxidante

Nos últimos anos, uma quantidade substancial de evidências tem indicado o papel chave dos radicais livres e outros antioxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (COTINGUIBAA et al. 2013). Devido aos efeitos colaterais dos antioxidantes sintéticos, vem aumentando significativamente o interesse em encontrar antioxidantes naturais para utilização em medicamentos e alimentos (BOTTERWERCK et al., 2000).

O extrato metanólico de *B. tetraphylla* foi avaliado pelo método de DPPH, em várias concentrações (25, 50, 100, 150 e 200 µg/mL), onde o mesmo mostrou uma capacidade antioxidante igual a 59,78%; 65,49%; 72,60%; 75,22% e 78,14%, respectivamente. Os resultados do controle e da amostra do teste podem ser vistos na figura 3. Ayres et al. (2009), utilizaram as mesmas concentrações e a metodologia de DPPH para atividade antioxidante com plantas da mesma família Combretaceae, onde os resultados foram semelhantes aos encontrados nesse trabalho corroborando. O extrato metanólico de *B. tetraphylla* apresentou resultado de IC₅₀ 64,66 ± 1,81 µg/mL similar ao ácido ascórbico (65,12 ± 1,04 µg/mL) ($p > 0,05$). Figueirôa et al. (2013) relacionaram a elevada atividade antioxidante de *Eugenia uniflora* com a presença de flavonóides e taninos. Assim, como a presença destes mesmos compostos no extrato metanólico de *B. tetraphylla*, podendo está relacionados a atividade antioxidante. Como descrito na literatura em estudo de outras famílias com os mesmo metabolitos secundários (MELLO; SANTOS, 2001; MUSCHIETTI; MARTINO, 2009; ROCHA et al., 2011).

Figura 3. Atividade antioxidante do Extrato metanólico da *B. tetraphylla*.



4. CONCLUSÃO

Em conclusão, este trabalho mostrou que *B. tetraphylla* é uma grande fonte de agentes antimicrobianos e antioxidantes. Demonstrando também que o extrato apresentou efeito sinérgico na maioria das linhagens testadas. Além disso, não apresentou toxicidade contra eritrócitos humanos. O extrato metanólico induziu importantes alterações morfológicas nas células tratadas. Portanto, apresenta-se como um promissor antifúngico no tratamento contra *C. albicans* e, além disso, esse estudo também contribui para pesquisas posteriores de plantas medicinais.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às agências brasileiras (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) pelo apoio financeiro concedido para realização deste trabalho. A Rede NANOBIOTEC-Brasil/CAPES, ao ICMBIO por autorizar a coleta no PARNA do Catimbau e ao Dr. Alexandre G. Silva pela identificação botânica.

6. REFÊRENCIAS

- AGRA, M.F., FREITAS, P.F., BARBOSA-FILHO, J.M. 17 Synopsis of the plants know as medicinal and poisonous in northeast of Brazil. **Brazilian journal of pharmacognosy**, 114-140. 2007.
- AGRA, M.F., SILVA, K.N., BASÍLIO, I.J.L.D., FREITAS, P.F., BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region northeast of Brazil. **Brazilian jornal of Pharmacognosy**, 18, 472-508. 2008.
- AGRA, M.F.; BARACHO, G.S.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; COELHO, V.P.M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, **Brazilian journal of pharmacognosy**, 111, 383- 395. 2007A.
- AMBER, K.; AIJAZ, A.; IMMACULATA, X.; LUQMAN, K.A.; NIKHAT, M. anticandidal effect of Ocimun sanctum essential oil and irs synergy with fluconazole and ketoconazole. **Phytomedicine**, v.17, p.921-925, 2010.
- AYRES, M. C. C.; CHAVES, M. H. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* mart. et zucc. **Quim. Nova**, vol. 32, no. 6, 1509-1512, 2009.
- BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de Allium cepa como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007.
- BLIOS, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**. 26:1199–1200.
- BOTTERWECK, A.A.M.; VERHEGEN, H.; GOLDBOHN, R.A.; KLEINJANS, J.; VAN DEN BRANDT, P.A. (2000). Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands Cohort Study. **Food Chem. Toxicol.** 38:599-605.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, DF, 2006b.
- BRUNEAU, J. M.; MAILLET, I.; TAGAT, E. et al. Drug induced proteome changes in *Candida albicans*: Comparison of the effect of β -(1,3)-glucan synthase inhibitors and two triazoles, flucnazole and itraconazole. **Proteomics**, v.3, p. 325-336, 2003.

CARVALHO, A. C. B., SILVEIRA, D. Drogas vegetais: uma antiga nova forma de utilização de plantas medicinais. **Brasília Med.** 2010;48(2):219-237.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2011). “Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (21st edn) Wayne: M100-S21”, Clinical and Laboratory Standards Institute.

COTINGUIBAA, G. G.; SILVA, J. R. N.; AZEVEDO, R. R. S.; ROCHA, T. J. M.; SANTOS, A. F. Methods of the antioxidant defense: a literature review. **Unopar cient ciênc biol saúde.** 2013;15(3):231-7.

COUTINHO, H. D.; COSTA, J. G.; LIMA, E.O.; FALCÃO-SILVA, V.S.; SIQUEIRA JR, J. P. Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* by *Tumera ulmifolia* L. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v.8, p9-13, 2009^a.

CUSHNIE, T. T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **Int J Antimicrob.** Ag 2005, 26:343–356.

DA SILVA, L. C. N., SILVA-JÚNIOR, C.A., SOUZA, R.M., MACEDO, A.J., SILVA, M.V., CORREITA, M.T. S (2011). Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. **Food Chem. Toxicol.**49:2222-2228.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: verdades e mentiras: o que os usuários e os profissionais de saúde precisam saber.** São Paulo: Ed. UNESP, 2007.

FIGUEIRÔA, E. O.; SILVA, L.C.N.; MELO, C.M.L.; NEVES, J.K.A.L.; SILVA, N.H.; PEREIRA, V.R.A.; CORREIA, M.T.S. Evaluation of antioxidant, immunomodulatory, and Cytotoxic action of fractions from *Eugenia uniflora* L. and *Eugenia malaccensis* L.:correlation with polyphenol and flavanoid content. **The ScientificWorld Journal.** 2013.

ESTRELLA-CUECA, M. Combinations of antifungal agentes in therapy-what value are they? **Journal of antimicrobial and chemotherapy**, v. 54, p.854-69, 2004.

GIORDANI, R.; REGLI, P.; KALOUSTIAN, J.; MIKAIL, C.; ABOU, L.; PORTUGAL, H. Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of Amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. **Phytotherapy research**, v.18, p.990-995, 2004.

HAN, Y. Synergic effect of grape seed extract with amphotericin B against disseminated candidiasis due to *Candida albicans*. **Phytomedicine**, v.14, p.733-738. 2007.

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

JANDÚ, J.J.B.; SILVA, L.C.N.; PEREIRA, A.P.C.; SOUZA, R.M.; SILVA JUNIOR, C. A.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; ARAÚJO, J.M.; CORREIA, M.T.S.; SILVA, M.V. *Myracrodruon urundeuva* bark: an antimicrobial, antioxidant and non-cytotoxic agente. **Journal of Medicinal Plants Research** Vol. 7(8), pp. 413-418, 25 February, 2013.

KATERERE, D. R.; GRAY, A. I.; NASH, R. J.; WAIGH, R. D. Phytochemical and antimicrobial investigations of stilbenoids and flavonoids isolated from three species of Combretaceae. **Fitoterapia** 83 (2012) 932–940.

LIU, H.; MOU, Y.; ZHAO, J. et al., “Flavonoids from *Halostachys caspica* and their antimicrobial and antioxidant activities,” **Molecules**, vol. 15, no. 11, pp. 7933–7945, 2010.

MANTHEY, J.A.; GUTHRIE, N.; GROHMANN, K. “Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation,” **Current Medicinal Chemistry**, vol. 8, no. 2, pp. 135–153, 2001.

MELLO, J. C.P.; SANTOS, S. C. TANINOS. IN: SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ed. PORTO ALEGRE: ED.UFGRS/ED.UFSC, 2001. CAP. 24, P.517-543.

MIYAZAKI, C. M. S.; HIROTA, B. C. K.; LIMA, C. P.; VERDAM, M. C. S.; PAULA, C. S.; CHAVES, S. C. ; NUNES, P. M. P ; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O.G. . Coumarin isolation and comparative study of biological activities of *Pterocaulon alopecuroides* DC and *Pterocaulon lorentzii* Malme. **International Journal of Phytomedicine**, v. 5, p. 298-301, 2013.

MONTEIRO, J.M.; ALMEIDA, C.F.C.B.R.; ALBUQUERQUE, U.P; LUCENA, R. F. P.; FLORENTINO, A.T.; OLIVEIRO, R. L. (2006). Use and traditional management of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan in the semi-arid region of northeastern Brazil. **Journal Ethnobiol. Ethnomed.** 2:1-6.

MUSCHIETTI, L.V.; MARTINO, V.S. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS FLAVONÓIDES NATURAIS. IN: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais**,

novos fármacos e a moderna farmacognosia. 2 ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2009. P.189-218.

NIGHTINGALE, C. H.; AMBROSE, P.G.; DRUSANO, G. L.; MURAKAWA, T. Antimicrobial pharmacodynamics in theory and clinical practice. 2. Ed. **New York medical**, 2007.

OLIVEIRA, Y. L. C.; SILVA, L. C. N.; SILVA, A. G.; MACEDO, A. J.; ARAÚJO, J. M.; CORREIA, M. T. S.; SILVA, M. V. Antimicrobial Activity and Phytochemical Screening of *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. Howard(Combretaceae: Combretaceae). **The Scientific World Journal**. Volume 2012.

PANKEY, G.A.; SABATH, L.D. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. **Clin Infect Dis**, 2004.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin Microbiol Rev** 20, 133-163.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. (2010) Epidemiology of invasive mycoses in North America. **Crit Rev Microbiol**. 36:1–53.

ROCHA, W. S. et al. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de fruticultura**, V. 33, N. 4, P. 1215-1221, 2011.

SAAD, A.; FADLI, M.; BOUAZIZ, M.; BENHARREF, A.; MEZRIOUI, N-E.; HASSANI, L. Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetti* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. **Phytomedicine** v.17, p.1057-1060, 2010.

SHAO, P.L.; HUANG, L.M.; HSUEH, P.R. (2007). Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections. **Int J Antimicrob Agents** 30, 487-495.

SHIN, S.; PYUN, M-S. Anti-candida effects of estragole in combination with ketoconazole or amphotericin B. **Phytotherapy Research**, v.18, p.827-30. 2004.

SILVA, J. F. V.; SILVA, L. C. N.; ARRUDA, I. R. S.; SILVA, A. G.; MACEDO, A. J.; ARAÚJO, J. M.; CORREIA, M. T. S.; SILVA, M. V.. Antimicrobial activity of *Pityrocarpa moniliformis* leaves and its capacity to enhance the activity of four antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of medicinal plants research**. Vol.7(28), pp.2067-2072, 25 July, 2013.

SILVA, L. C. N. ; SANDES, J. M.; PAIVA, M. M. ; ARAÚJO, J. M. ; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. ; SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. S. . Anti-Staphylococcus aureus action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. **Natural Product Research (Print)**; 2012.

SILVA, R. C.; NETO, J. B. A.; 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 agentes and chemotherapy**. V. 58 n.3, março 2014.

SUSAN, G.W.K.; TANYA, E.S.D. High spatial resolution surface imaging and analysis of fungal cells using SEM and AFM. **Micron** 2008, 39:349-61.

SUZGEC-SELCUKA, S.; BIRTEKSÖZB, A. S. “Flavonoids of *Helichrysum chasmolycicum* and its antioxidant and antimicrobial activities,” **South African Journal of Botany**, vol. 77, pp. 170–174, 2011.

TYAGI, A.K.; MALIK, A. Liquid and vapour-phase antifungal actives of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopic observations and chemical characterization. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 2010.

TRENTIN, D.S.; GIORDANI, R.B.; ZIMMER, K.R.; SILVA, A.G., SILVA, M.S.; CORREIRA, M.T.S.; BAUMVOL, I.J.R.; MACEDO, A.J. (2011). Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal Ethnopharmacol.**137:327-35.

VIOLANTE, I.M.P. **Avaliação do potencial antimicrobiano e citotóxico de espécies vegetais do cerrado da região centro-oeste**. Dissertação do programa de saúde e desenvolvimento da região centro-oeste. Universidade federal de mato grosso do sul. Campo Grande, 2008.

VIOLANTE, I.M.P.; SOUSA, I.M.; VENTURINI, C.I.; RAMALHO, A.F.S.; SANTOS, R.A.N.; FERRARI, M. Avaliação in vitro da atividade fotoprotetora de extrato vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Rev. Bras. Farmacogn.** 2009; 19(2):452-457.

VUUREN, S.V.; VILJOEN, A. (2011). Plant-Based Antimicrobial Studies Methods and Approaches to Study the Interaction between Natural Products. *Planta Med.* 77:1168–1182.

WAGNER, H., ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v.16, p.97-110, 2009.

WEAVER, P. L. “*Buchenavia tetraphylla* (Vahl.) Eichler: Granadillo,” Tech. Rep. SO-ITF-SM-43, Department of Agriculture, Southern Forest Experiment Station, **New Orleans**, 1991.

YANG, Y.L. 2003. Virulence factors of *Candida* species. **Journal Microbiol. Immunol. Infect.**36, 223–228.

YOUSSEFBEYK, F.; GOHARI, A. R.; HASHEMIGHADERIJANI, Z.; OSTAD, S. N.; SOURMAGHI, M. H. S.; AMINI, M.; GOLFAKHRABADI, F.; JAMALIFAR, H.; AMIN, G. Bioactive Terpenoids and Flavonoids from *Daucus littoralis* Smith subsp. *hyrcanicus* Rech.f, na Endemic Species of Iran. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. 2014.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo permitem concluir que:

- Os extratos de *Buchenavia tetraphylla* na triagem fitoquímica, mostraram a presença de hidrocarbonetos, açúcares, glicosídeos, terpenos, taninos e flavonóides.
- Os quatros extratos testados de *B. tetraphylla*, apresentaram atividade antifúngica, sendo o extrato metanólico o que obteve maior atividade frente a *Candida albicans*.
- Na avaliação sinérgica do extrato metanólico associado com o antifúngico fluconazol apresentou um efeito sinérgico para a maioria das linhagens de *Candida albicans* testadas.
- No ensaio *in vitro*, o extrato metanólico apresentou grande capacidade de sequestrar radicais livres através do método de DPPH, demonstrando potencial antioxidantes.
- O extrato metanólico de *B. tetraphylla* não apresentou efeito citotóxico em eritrócitos humanos nas concentrações testadas.
- O extrato metanólico em estudo induziu importantes alterações morfológicas nas células tratadas.
- O referido extrato apresenta-se como um promissor antifúngico no tratamento contra *C. albicans* e, além disso, esse estudo também contribui para pesquisas posteriores de plantas medicinais.