



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

JOSÉ ROBSON NEVES CAVALCANTI FILHO

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE METANÓLITOS
SECUNDÁRIOS DE FOLHAS DE *Buchenavia tetraphylla* R.A. HOWARD
(COMBRETACEAE: COMBRETOIDEAE)

Recife

2018

JOSÉ ROBSON NEVES CAVALCANTI FILHO

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS DE FOLHAS DE *Buchenavia tetraphylla* R.A. HOWARD
(COMBRETACEAE: COMBRETOIDEAE)

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnológica

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Tereza dos Santos Correia

Co-orientadora: Prof^a Dr^o Luis Cláudio Nascimento da Silva

Recife

2018

Catálogo na fonte
Elaine C. Barroso (CRB4/1728)

Cavalcanti Filho, José Robson Neves

Isolamento, caracterização e aplicação de metanólitos secundários de folhas de *Buchenavia tetraphylla* R.A. Howard (Combretaceae: Combretaceae) / José Robson Neves Cavalcanti Filho- 2018.

84 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Coorientador: Luis Cláudio Nascimento da Silva

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

Inclui referências

1. *Candida Albicans* 2. Metanólitos 3. Caatinga I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orient.) II. Silva, Luis Cláudio Nascimento da (coorient.) III. Título

579.55

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-426

JOSÉ ROBSON NEVES CAVALCANTI FILHO

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS DE FOLHAS DE *Buchenavia tetraphylla* R.A. HOWARD
(COMBRETACEAE: COMBRETOIDEAE)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnológica

Aprovada em: 25/07/2018

Banca examinadora:

Prof^ª.Dr^ª. Maria Tereza dos Santos Correia
Departamento de Bioquímica – UFPE

Prof^ª.Dr^ª. Marcia Vanusa Silva
Departamento de Bioquímica – UFPE

Prof. Dr^ª. Patricia Maria Guedes Paiva
Departamento de Bioquímica – UFPE

Prof^ª. Dr^ª. Norma Buarque de Gusmão
Departamento de Antibióticos – UFPE

Prof. Dr. Clovis Macêdo Bezerra Filho

UNINASSAU

AGRADECIMENTOS

Como começar agradecendo...

Primeiramente a Deus, porque sem ele não teria conseguido chegar ao fim, ele que traçou tudo na minha caminhada que começou a muito tempo. Meus pais que com eles tive todo o processo de aprendizagem e crescimento, além de proporcionar tudo em minha vida como a parte de amor, carinho, compreensão e financeira. As minhas irmãs que muitas vezes abdicaram de várias coisas para que eu tivesse o melhor até chegar a ser Doutor (de verdade). Queria agradecer a minha família (tias, tios e primos) que mesmo indiretamente me deram força nesta caminhada. Meus avós que estão em memória e sei que tinham o maior orgulho e vontade que meus sonhos se tornassem realidade. A meus sobrinhos e cunhado.

A minha Orientadora Maria Tereza, por tudo! Como sempre falo por ter me aceitado sem me conhecer e por da todas as orientações possíveis. A minha primeira orientadora Norma, por ser tão compreensiva, amorosa e uma mãe para todos. As professoras Márcia e Leonor, por também ajudarem e contribuírem para minha formação. A meu co-orientador Luís Cláudio por ser compreensivo, brabo, amigo e paciente, comigo.

As minhas anjinhas Mama e Talyce, que começaram a caminha comigo e depois seguiram outro rumo, mesmo assim escutaram todas as minhas brigas e aperreios. Aos meus amigos da faculdade, que hoje ainda continuam comigo Bruna, Fernanda, Raissa, Maira, Tate, Ana Lygia e Maria Preta; que me deram todas as forças possíveis para minha vida acadêmica.

Como agradecer aos amigos do LAMAI (Aliny, Erik, Camila, Beth, Igor, Maria Claudia, Rafa Manaus, Rapha, Diana, Rita, Tales, Patrícia, Ângela, Jaci, Blea, Jeane, Dany e Evelyne). Gostaria de agradecer em especial a Pérsio, Flávia, Glezia e minha madrinha Nel, que sempre estiveram comigo e me ajudaram em tudo (até arrumar a orientadora). A meus amigos de vida Livia, Bruno, Horta, Rebeca, Marcos, Marly, Rafa, Mari, Glaudemir e San. Aos meus IC's Thiago, Polly e Giovana que deram um pedaço de cada um nessa qualificação.

A meus amigos/irmãos que a UPE me deu Lucas Melo, Marcella Lydia, Beatriz Borges, Marilia Moura, Mariana Gama, Bira Neto, Marcella Arruda, Victor Moura, Ianne, Caio, Alexandre Moura, Marana Alves e Marcelo.

Essas benções Renata, Missi, Kedma, Lari e Roberto que acreditam um pouco em mim rrsrs

Obrigado a todos de coração, vocês fazem parte da minha história

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. 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. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar os metabólitos secundários de *B. tetraphylla* ativos contra isolados clínicos de *C. albicans*, avaliando os potenciais de anti-virulência. Folhas de *B. tetraphylla* coletadas em Buíque-PE, foram secas e moídas. O fracionamento do extrato metanólico foi realizado por cromatografia em coluna aberta Sephadex LH-20, apresentou 11 frações. A atividade antimicrobiana foi determinada com uso da fração I pela determinação das Concentrações Mínima Inibitória (CMI) e Mínima Fungicida (CMF) contra a linhagem padrão de *C. albicans* (UFPEDA1007), e cepas clínicas recentes. Resazurina (0,01%) foi utilizada como indicador do crescimento microbiano. Os valores do CMI e CMF foram satisfatório para todas as linhagens testadas, mesmo tratada com extrato metanólico e com a fração I desse mesmo extrato. As análises de microscopia eletrônica de varredura revelaram, como esperado, que as leveduras sem tratamento apresentaram formas ovais normais com superfícies lisas e possuíam pseudo-hifas, que estão presente caracteristicamente em células patogênicas. Nas células tratadas com o valor do CMI do extrato metanólico foi observado modificações externas das células, apresentando maiores rachaduras e encolhimento da parede celular, certamente devido à perda de volume citosólico, além da inibição da formação de pseudo-hifas. Os micro-organismos testados apresentaram grande potencial de virulência e quando tratados com a fração I apresentou redução nesse potencial. A fração I foi identificada e demonstrou a presença de buchenavianina e seus análogos. Assim, estes resultados estimulam novas pesquisas sobre aspectos farmacológicos e citotóxicos dos extratos e suas frações de *B. tetraphylla* a fim de apoiar a sua aplicação como agente antimicrobiano.

Palavras-chave: Caatinga. *Buchenavia tetraphylla*. buchenavianina. *Candida albicans*.

ABSTRACT

The frequency of invasive fungal infections due to opportunistic pathogenic fungi has clearly increased in recent years, been *Candida albicans* responsible for most cases. Thus, it is important to search for new sources of anti-*C. albicans* bioactive molecules. *Buchenavia tetraphylla* (Combretaceae) is a neotropical species, distributed from Cuba to Rio de Janeiro, being an ethnomedicinal plant used by traditional communities in the Northeast region of Brazil. In recent research using leaves of *B. tetraphylla* its antimicrobial activity has been proven. In this context, the objective of this work was to identify and characterize the secondary metabolites of *B. tetraphylla* active against clinical isolates of *C. albicans*, evaluating anti-virulence potentials. *B. tetraphylla* leaves collected in the Catimbau National Park (Buíque, Pernambuco, Brazil) were dried and milled through the Macsalab mil (Model 200 LAB) equipment. Fractionation of the methanolic extract was performed by Sephadex LH-20 open column chromatography, where it presented 11 fractions. The antimicrobial activity was determined using fraction I by determining the Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) and Minimum Fungicide (CMF) against the standard *C. albicans* lineage (UFPEDA1007), and recent clinical strains. Resazurin (0.01%) was used as an indicator of microbial growth. MIC and CMF values were satisfactory for all strains tested, even when treated with methanolic extract and fraction I of the same extract. Scanning electron microscopy analyzes revealed, as expected, that untreated yeasts had normal oval forms with smooth surfaces and possessed pseudohyphae, which are characteristically present in pathogenic cells. In the cells treated with the MIC value of the methanolic extract, external cell modifications were observed, presenting larger cracks and shrinkage of the cell wall, certainly due to the loss of cytosolic volume, besides the inhibition of the formation of pseudohyphae. The microorganisms tested showed great virulence potential and when treated with fraction I presented a reduction in this potential. Fraction I was identified and demonstrated the presence of buchenavianina and its analogues. Thus, these results stimulate new research on pharmacological and cytotoxic aspects of extracts and their fractions of *B. tetraphylla* in order to support their application as an antimicrobial agent.

Keywords: Caatinga. *Buchenavia tetraphylla*. buchenavianina. *Candida albicans*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Os gêneros <i>Staphylococcus</i> e <i>Candida</i> em microscopia eletrônica de varredura e presente na infecção. A) imagem de <i>Staphylococcus aureus</i> por microscopia eletrônica de varredura. B) Infecção por <i>Staphylococcus aureus</i> . C) imagem de <i>Candida albicans</i> por microscopia eletrônica de varredura D) infecção por <i>Candida albicans</i> presente na cavidade oral.....	17
Figura 2 - <i>Candida albicans</i> : A- forma oval (levedura) e B- Forma filamentosa (pseudo-hifas)	19
Figura 3 - Processo de formação de biofilmes baseado em etapas. (a) colonização primária, (b) divisão e proliferação celular, (c) colonização secundária e (d) etapa final da formação de biofilme.....	22
Figura 4 - Esquema de fatores de influências na síntese de metabólitos secundários.....	25
Figura 5 - Esquema das vias do metabolismo secundário de plantas.....	26
Figura 6 - Mapa da localização do bioma Caatinga	31
Figura 7 – <i>Buchenavia tetraphylla</i> : planta (A) e folhas (B).....	33

LISTA DE FIGURAS ARTIGO 1

Figura 1 – Combinatory affects os BTME and fluconazole against <i>Candida albicans</i> . Non: non-interactive effect; syn: synergistic effect;ant;antagonistic effect.....	37
Figura 2 – Effects of BTME on <i>C. Albicans</i> . (a-c)Control cells; (d-f) cells treated with BTME at MIC for 12h, (a-c) Ultrastructuralaspects of untreated <i>C. Albicans</i> culture at low (a) and high magnification (b-c) showing the presence of single and budding yeast cells with evident fragile blastoconidial septum (white arrow). (h) True hyphal structures could be also observed, Treated <i>C. Albicans</i> culture at (d) low and (e-f) high magnification. Note in (e) the presence of elongated cells (white asterisk) with multiple scars (white arrow). (f) Cells presenting surface depressions are indicated in white arrow.....	38

Figura 3 – Effects of BTME on nitric oxide production by J774 macrophages. *Significant differences in relation to control ($p < 0.05$).....	39
--	----

LISTA DE FIGURAS ARTIGO 3

Figura 1- Estrutura de buchenavianina e seus derivados. (A) Buchenavianina; (B) N-desmetilbuchenavianina (C) O-desmetilbuchenavianine (D) N-O-desmetilbuchenavianina. .	53
Figura 2 – Inibição de hifas da linhagem de Candida albicans (F27) tratada com fração I do extrato metanólico da B. Tetraphylla.....	57
Figura 3 – Atividade anti-biofilme da fração I de C. Albicans.....	58
Figura 4 – Hidrofobicidade de Superfície Celular de células tratadas com a fração I do extrato metanólico de B. tetraphylla.....	60
Figura 5 – Produção e Inibição da Proteinase	61
Figura 6 – halo produção de proteinase.....	61
Figura 7 – Ensaio antimicrobiano in vivo com Tenebrio molitor.....	62

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS ARTIGO 1

Tabela 1 – Antibiotic-resistance profile of C. Albicans clinical strains isolated from vaginal secretion samples.....	35
Tabela 2 – Phytochemical analysis of B. Tetraphylla leaves extracts.....	36
Tabela 3 – The anti-Candida albicans activity of extracts from B. Tetraphylla leaves.....	37

LISTA DE TABELAS ARTIGO 2

Tabela 1 – Anti-biofilm from the methanolic extract of Buchenavia tetraphylla.	43
---	----

LISTA DE TABELAS ARTIGO 3

Tabela 1 – Analise anti-Candida das frações oelo ensaio de teste de difusão em meio solido	54
Tabela 2 – Analise anti-Candida das frações B, D, I, pelo ensaio de teste em disco contra espécies clínicas isoladas de secreção vaginal.....	55
Tabela 3 – Atividade anti-C. Albicans da fração I do extrato metanólico da B. Tetraphylla. ..	56

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVOS.....	16
1.1.1 Objetivo Geral.....	16
1.1.2 Objetivo Específico	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 INFECÇÕES RELACIONADAS COM ASSISTÊNCIA À SAÚDE	17
2.2 <i>CANDIDA ALBICANS</i>	18
2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA	20
2.4 PLANTAS MEDICINAIS	22
2.5 COMPOSTOS BIOATIVOS DE PLANTAS	24
2.5.1 Terpenos	27
2.5.2 Flavonóides	27
2.5.3 Taninos	28
2.6 CAANTIGA.....	29
2.7 FAMILIA COMBRETACEAE	31
2.8 <i>BUCHENAVIA TETRAPHYLLA</i>	33
3 RESULTADOS	34
3.1 ATIVIDADES ANTIMICROBINA DE <i>BUCHENAVIA TETRAPHYLLA</i> CONTRA ESPECIES DE <i>C. ALBICANS</i> ISOLADAS DE SECREÇÃO VAGINAL.....	34
3.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO EXTRATO METANÓLICO DA <i>B.</i> <i>TETRAPHYLLA</i>	41

3.3 ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E POTENCIAL DE VIRULÊNCIA DE <i>BUCHENAVIA TETRAPHYLLA</i> CONTRA <i>CANDIDA ALBICANS</i>	45
4 CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

A cada ano bactérias, fungos e vírus são responsáveis por acometer mais de dois milhões de pessoas, causando, muitas vezes, óbitos por serem resistentes a diversas drogas que se tornaram ineficazes para o tratamento das infecções causadas por esses agentes. Segundo a ANVISA (2014), os gêneros *Staphylococcus* e *Candida* foram os mais encontrados em infecções hospitalares causadas por bactérias e leveduras, respectivamente. Estudos realizados pelo Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac” (2011), localizado em São Paulo - SP, mostraram que as infecções hospitalares constituem um sério problema de saúde pública em todo o mundo, representando gastos nos EUA e Reino Unido em torno de 6,7 bilhões de dólares e 1,06 bilhões de libras respectivamente. No Brasil, observa-se uma taxa de 15,5% de infecções hospitalares, com gasto de aproximadamente 5,5 bilhões de reais por ano causando um impacto econômico no país (SILVA et al., 2017). Neste contexto a busca de novos agentes antimicrobianos é de extrema importância.

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. Por ser oportunista, alguns fatores relacionados ao hospedeiro (mudança de pH vaginal, imunidade baixa, uso de antibióticos, anticoncepcionais, estresse, entre outros) favorece o seu crescimento e adesão, com consequente invasão dos tecidos e infecção.

Devido à resistência de *C. albicans* a drogas já conhecidas, faz-se necessária a busca de novos compostos eficazes para o combate a essas leveduras. Os produtos de origem natural vêm sendo testados contra micro-organismos e já é comprovada sua eficácia na inibição desses patógenos. As plantas têm se tornado fontes potenciais de moléculas com propriedades medicinais, pois são fontes de metabólitos secundários com diversidade molecular muito superior àquelas derivadas de produtos sintéticos.

A Caatinga, domínio fitogeográfico exclusivo brasileiro, localizado majoritariamente na região do semiárido nordestino, ocupa uma área de mais de 900 mil km² com variada constituição de fauna e flora. As múltiplas variáveis geoclimáticas, aliadas ao contexto socioeconômico, aumentam o interesse para exploração mais

profunda do potencial biotecnológico da Caatinga. Diversas plantas desse bioma são classificadas como medicinais por possuírem substâncias com ação farmacológica. Os compostos orgânicos naturais de origem vegetal, tais como os flavonoides, terpenos, taninos entre outros, têm apresentado ação tranquilizante, analgésica, antiinflamatória, citotóxica, anticoncepcional, antimicrobiana, antiviral, fungicida e inseticida.

Buchenavia tetraphylla (Aubl.) R.A. Howard (Combretaceae: Combretoideae) é uma espécie neotropical, distribuída desde a Ilha de Cuba (América Central) até estado do Rio de Janeiro, no Sudeste brasileiro (América do Sul). No Brasil, esta planta é popularmente conhecida como “tanimbuca” e é relacionada como uma planta etnomedicinal por comunidades tradicionais na região Nordeste do Brasil. Em recentes estudos do nosso grupo, um elevado potencial anti-*S. aureus* e anti-*C.albicans* foi observado para extratos/frações de folhas de *B. tetraphylla*. A investigação da ação antimicrobiana dos extratos e a identificação dos mecanismos de ação relacionados representam um passo fundamental para o uso destes compostos isolados do fracionamento do extrato metanólico de *B. tetraohylla* como produtos para as indústrias farmacêuticas, pois são de baixo custo e com eficácia já descrita na literatura. Além disso, o Brasil é o país com maior reserva florestal 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. Muitas das publicações se referem a ensaios empíricos com base no dito popular e apenas 1% das espécies vegetais foi validada por estudos científicos (FRANCISCO, 2010).

Nesse trabalho foi avaliada, a atividade anti-*Candida* e as alterações ultraestruturais induzidas em isolados clínicos de *C. albicans*, de extratos e uma de suas frações obtidos de folhas de *B. tetraphylla* além da análise dos seus potenciais citotóxicos contra eritrócitos humanos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Identificar e caracterizar metabólitos secundários de *B. Tetraphylla* ativos contra isolados clínicos de *C. albicans*, avaliando os potenciais de anti-virulência.

1.1.2 Objetivo Específico

- Extrair, caracterizar e identificar os extratos orgênicos de *B. Tetraphylla*;
- Mensurar a suscetibilidade das linhagens de *C. albicans* a drogas comerciais;
- Determinar a Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Microbicida (CMM) do extrato/fração de *B. tetraphylla* contra *C. albicans*;
- Verificar o sinergismo do extrato metanólico de *B. tetraphylla* com antifúngicos utilizado na terapêutica (fluconazol);
- Determinar a atividade hemolítica do extrato metanólico de *B. tetraphylla* utilizando eritrócitos humanos;
- Determinação de produção de óxido nítrico e viabilidade celular de macrófagos tratados com extrato metanólico de *B. tetraphylla*;
- Analisar alterações ultra-estruturais da *C. albicans* através de microscopia de varredura;
- Efetuar fracionamento cromatográfico do extrato metanólico, visando separar a composição química da espécie em estudo;
- Identificar os compostos isolados que foram fracionados na cromatografia;
- Avaliar o potencial antibiofilme, antimicrobiano e anti-virulência dos compostos isolados contra *Candida albicans*;
- Aplicar os compostos isolados no fracionamento em modelos de infecção *in vivo* utilizando o inseto *Tenebrio molitor*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 INFECÇÕES RELACIONADAS COM ASSISTÊNCIA À SAÚDE

A infecção relacionada com assistência à saúde (IRAS) ganhou destaque no Brasil a partir dos anos 70. A transmissão de micro-organismos no meio hospitalar representava uma grande preocupação para todos os profissionais da área da saúde sendo uma das principais causas de morte em pacientes hospitalizados mundialmente (ANVISA, 2014).

No Brasil, o Ministério da Saúde mostra que a taxa média de infecção hospitalar é de aproximadamente 15%. Na Europa e Estados Unidos da América representa cerca de 10%, no mundo está diretamente relacionado ao grau de complexidade de cada hospital. Os gêneros *Staphylococcus* e *Candida* (figura 1) foram os mais encontrados nas infecções hospitalares causadas por bactérias e leveduras (ANVISA, 2007; GASPAR et al., 2012; BARROS et al., 2012; DOI et al., 2016). Esse tipo de infecção constitui um sério problema de saúde pública em todo mundo e, em alguns países vêm crescendo os gastos com Infecção Hospitalar (IH): nos EUA e Reino Unido os gastos foram em torno de 6,7 bilhões de dólares e 1,06 bilhões de libras, respectivamente.

Figura3 - Os gêneros *Staphylococcus* e *Candida* em microscopia eletrônica de varredura e presente na infecção. A) imagem de *Staphylococcus aureus* por microscopia eletrônica de varredura. B) Infecção por *Staphylococcus aureus*. C) imagem de *Candida albicans* por microscopia eletrônica de varredura D) infecção por *Candida albicans* presente na cavidade oral.





Fonte: Barros et al. (2012)

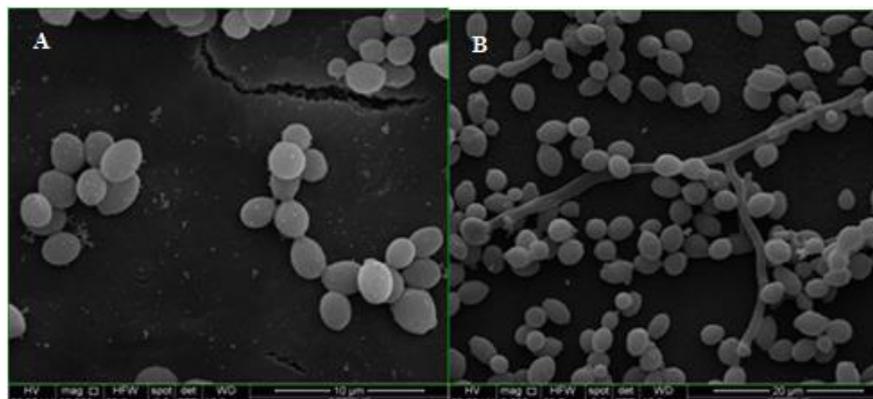
Em pesquisa realizada por Barros et al. (2012), foram identificados vários micro-organismos de ambiente hospitalar causadores de IRAS. Em destaque, a *Pseudomonas* sp. (5,4%), *Staphylococcus aureus* (4,7%), *Proteus mirabilis* (4,1%), *Klebsiela* sp (2,7%), além do *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus gallinarium*, leveduras e *Raoutella ornithinolytica*.

2.2 CANDIDA ALBICANS

Gênero *Candida* pertencem ao Reino Fungi, grupo Eumycota, filo Ascomycota, classe Blastomycetes e fazem parte da família Criptococcaceae. Dentre as 200 espécies deste gênero, a *C. albicans* é uma das mais virulentas, estando frequentemente envolvida em candidíases, com prevalência na Europa, Canadá e nas Américas (COLOMBO et al., 2013; CRISEO et al., 2015; CHIN et al., 2016).

Esse gênero apresenta várias características como blastoconídeos globosos e ovóides, gram-positivo, dimórfico (formação de micélio), saprófita, que apresentam virulência limitada. As espécies de *Candida* podem reproduzir-se por gemulação, dando à célula uma forma oval (figura 2A), característica das leveduras, ou podem crescer sob a forma filamentosa (figura 2B) através da produção de tubos germinativos resultando numa conversão da forma de levedura para um crescimento em forma de micélio, com produção de pseudo-hifas (LACAZ et al., 2002; CARDOSO, 2004; WILLIAMS et al., 2011).

Figura4 – *Candida albicans*: A- forma oval (levedura) e B- Forma filamentosa (pseudo-hifas)



As espécies do gênero *Candida* são oportunistas e alguns fatores desencadeadores são necessários para que ocorra a manifestação e/ou 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 imunodeficiências; alguns pesquisadores afirmam que a região geográfica e o clima podem fazer parte desse processo (DRAKE; MAIBACH, 1974; SOBEL, 2007; HOLANDA et al., 2007; NYIRJESY, 2008; KENNEDY; SOBEL, 2010; AHMADEY; MOHAMED, 2014; CAUCHIE et al., 2017; BRADFORD; RAVEL, 2017).

A patogenicidade de um micro-organismo é definida por múltiplos fatores que determinam a doença. 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; ISHIDA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013; HÖFS et al., 2016).

Dentre os fatores de virulência, os mais reconhecidos são para espécies de *Candida*: 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 biofilme. (FILHO et al., 2017; CALDERONE, FONZI, 2001; HASAN et al., 2009; SILVA et al., 2011) .

2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

A virulência de determinados micro-organismos é determinada geneticamente e expressa apenas quando estão em condições favoráveis. A *Candida*, quando expressa o gene de virulência passa de uma levedura inofensiva comensal a patógeno. Tais fatores permitem que ela cause infecções e invadam os tecidos do hospedeiro (GHANNOUM; RADWAN, 1990; VAZQUES et al.; 2014; CASSONE, 2015; HÖFS et al., 2016).

A proteinase é umas das enzimas responsáveis pela capacidade de adesão celular, secretada junto à fosfolipase e lipase que também participam no processo fundamental para a virulência da *C. albicans*, sendo um pré-requisito na formação de biofilme. A elevada produção de proteinase por esta espécie de levedura leva a uma maior aderência às células do epitélio, penetração e destruição tecidual. As proteinases de um modo geral estão envolvidas em vários processos que incluem a formação de pseudomicélio, aderência e o fenômeno “switching” e contribuem ainda mais para a patogenicidade das e leveduras (HARTMANN et al., 2016). O estudo realizado por Hartmann et al. (2016), que avaliou a incidência de *Candida* spp. na mucosa oral de pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) no município de Santo Ângelo, no estado de Goiás-Brasil, mostrou que todas as espécies apresentaram atividades positivas para proteinase, revelando que as enzimas hidrolíticas quando secretadas por micro-organismos são de grande importância no fator de virulência (COSTA, 2009).

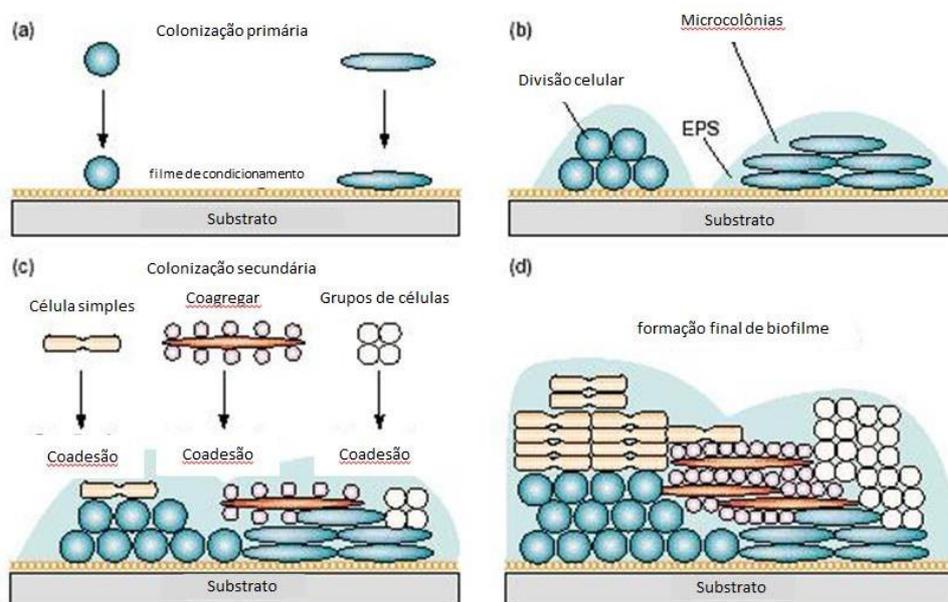
A formação de pseudo-hifas, que está correlacionada com o dimorfismo, a capacidade de crescimento como blastoporos, pseudo-hifas e hifas, é um dos fatores virulência nos casos de infecções pelas espécies de *Candida*. As variações de dimorfismo podem ser induzidas por condições ambientais favoráveis como temperatura, baixa de imunidade do hospedeiro, pH neutro, CO₂, nutrientes (fontes de

carbono, nitrogênio e aminoácido) entre outros fatores (GERALDINO et al., 2012; CALDERONE et al., 2001; NAGLIK et al., 2004). Assim, a forma filamentosa geralmente está ligada a doenças e à invasão tecidual, enquanto o formato leveduriforme está associado ao estado comensal (ISHIDA, 2010). Pesquisas realizadas por Shi et al. (2002), demonstraram em duas linhagens de *Candida* submetidas a variações ambientais (mudanças de pH, temperatura, entre outros), a formação de pseudo-hifas, tornando-as patogênicas.

A formação de biofilme por *Candida* apresenta uma alta patogenicidade causando resistência a antifúngicos. O biofilme compreende colônias microbianas envoltas por uma matriz extracelular e aderidas a uma superfície. Segundo Gulati e Nobile (2016), o primeiro relato científico sobre biofilme foi em 1638 descrito por Antonie Van Leeuwenhoek em um artigo para a Sociedade Real de Londres. Nas últimas décadas, vem crescendo a quantidade de estudos científicos sobre biofilme que, em grande maioria são encontrados em associação com outros micro-organismos, criando uma comunidade (GULATI; NOBILE, 2016).

O processo de formação de biofilmes (Figura 3) é baseado em etapas e começa basicamente com a adesão, formação de colônias, proliferação e diferenciação, secreção de matriz extracelular, maturação e dispersão (CAMPOS, 2017; VERMELHO, 2007). Estudos sugerem um papel importante da matriz extracelular nesse processo, mostrando que a arquitetura do biofilme age no sequestro dos fármacos, impedindo que esses medicamentos desencadeiem o resultado esperado (VALENTÍN et al., 2012; BARROS et al., 2016; YU et al., 2016). Cavalcanti Filho et al (2016), demonstraram que o extrato metanólico de *Buchenavia tetraphylla* inibiu a formação de biofilme em amostras de *Candida albicans* isolada de cultura vaginal.

Figura3 - Processo de formação de biofilmes baseado em etapas. (a) colonização primária, (b) divisão e proliferação celular, (c) colonização secundária e (d) etapa final da formação de biofilme.



Fonte: Shakya et al. (2017)

2.4 PLANTAS MEDICINAIS

Desde o 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 plantas com finalidade medicinal, principalmente em regiões onde o acesso ao cuidado de saúde formal é limitado, e 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; AWAD; AWAAD, 2017).

No Brasil, a utilização das plantas como fonte de medicamentos teve influências das culturas indígena, africana e europeia. Um exemplo é o uso da raiz da *Psychotria ipecacuanha* (nome popular Ipeca), pelos humanos, para alívio de cólicas e diarreias. Os pajés associavam o uso de plantas a rituais de magia e seus tratamentos eram

transmitidos oralmente de uma geração a outra (LORENZI; MATOS, 2002; JORGE; MORAIS, 2003).

As plantas são uma fonte excepcional de produtos naturais bioativos. Esses compostos são cruciais para o desenvolvimento de diversos fármacos comercializados no mundo inteiro, devido a sua elevada diversidade molecular, sendo maior do que os compostos derivados dos processos de síntese química. A complexidade e variedade desses metabólitos são resultados de influências ambientais (BRESOLIN; CECHINEL-FILHO, 2003; ALVES, 2008; SHER, 2009). Os metabólitos secundários estão especialmente relacionados às propriedades terapêuticas das plantas sendo quatro as principais classes com significado para o homem: alcaloides, fenilpropanoides, flavonoides e terpenóides (NEVES; CUNHA, 2006).

Esses compostos são responsáveis pelos efeitos medicinais, ou tóxicos, das plantas e 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, esses metabólitos são importantes no mecanismo de defesa das plantas contra predadores, sejam fungos, bactérias, vírus, parasitas, insetos, moluscos ou animais superiores. Algumas plantas superiores podem formar substâncias de natureza antimicrobiana, antifúngicas e antitumorais (YUNES; CALIXTO, 2001).

No mundo inteiro, 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 Brasil em relação às plantas medicinais, por exemplo, para o uso nos serviços público de saúde. O 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) (RESINUS, 2009; GIRALDI; HANAZAKI, 2010; SILVELLO, 2010; BRASIL, 2011).

2.5 COMPOSTOS BIOATIVOS DE PLANTAS

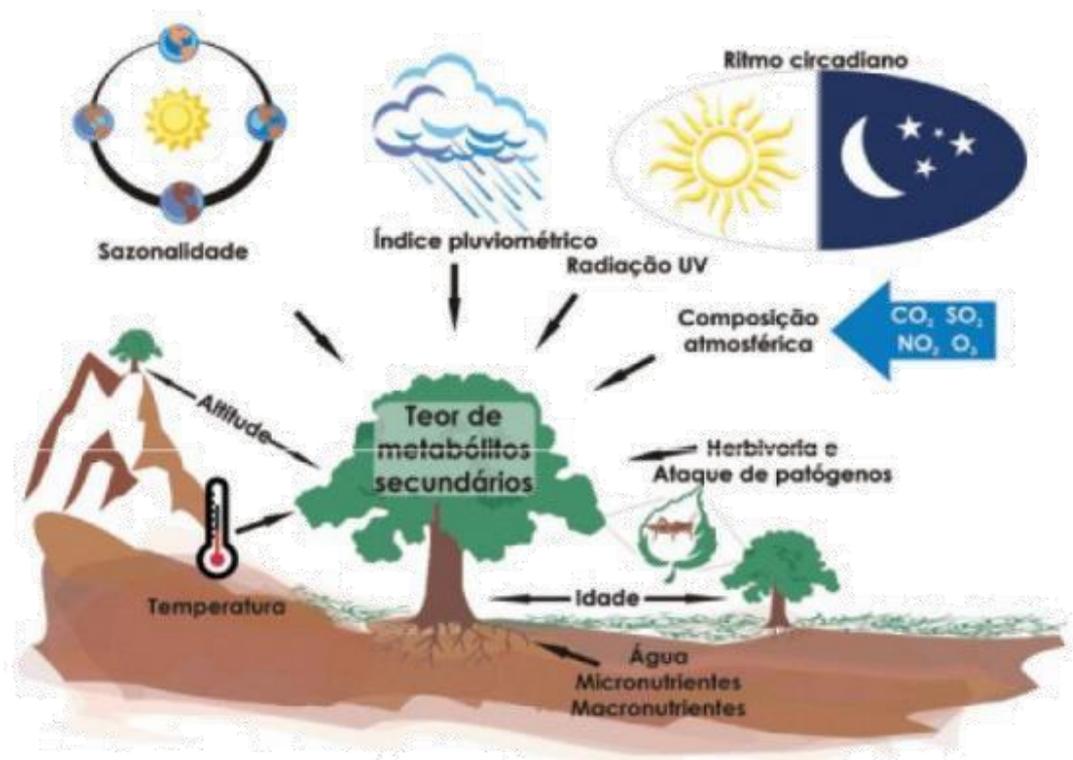
Há séculos a população utiliza produtos naturais para o tratamento de diferentes patologias. Diversas atividades biológicas dessas plantas já foram descritas na literatura como atividades antimicrobiana, antitumoral, antioxidante, entre outras. (MARISCO & PUNGARTNIK, 2015; ZIELINSKI et al., 2014; ALEZANDRE et al. 2017). A maioria dos princípios ativos de importância farmacológica encontrada nos extratos vegetais, de modo geral, é oriunda de uma variedade de metabólitos secundários (FERREIRA; PINTO, 2010, SILVA; LIMA, 2016).

O conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial no vegetal, tais como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos, entende-se por metabolismo primário. Assim, os compostos envolvidos nesse processo possuem uma distribuição universal nas plantas. São eles: aminoácidos, nucleotídeos, lipídios, carboidratos e a clorofila. A produção dos metabólitos secundários é de fundamental importância para a adaptação das plantas aos seus ambientes; essas moléculas contribuem para que as mesmas possam ter uma boa interação com os diferentes ecossistemas. Esses metabólitos despertam interesse não só pelas atividades biológicas produzidas pelas plantas em resposta aos estímulos do meio ambiente, mas pela imensa atividade farmacológica desses compostos (SILVA; LIMA, 2016; SHAKYA et al., 2017).

A síntese dos metabólitos secundários pelas plantas consiste em um processo de várias etapas influenciadas por diferentes variáveis (figura 4) tais como, temperatura, umidade, luminosidade, disponibilidade de água, radiação, sazonalidade, entre outras. Os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, fatores bióticos e abióticos podem interferir com a qualidade e a quantidade de produtos secundários resultantes do metabolismo de uma planta em determinado momento. A fantástica variedade e complexidade de metabólitos especiais biossintetizados pelas plantas se formou e evoluiu como mecanismo de defesa desses vegetais às condições ambientais ricas em microrganismos, insetos, animais e também às condições de adaptação e regulação do meio ambiente (GOBBO-NETO;

LOPES, 2007; ALVES, 2001; FERREIRA; PINTO, 2010; SILVA; LIMA, 2016; SHAKYA et al. 2017).

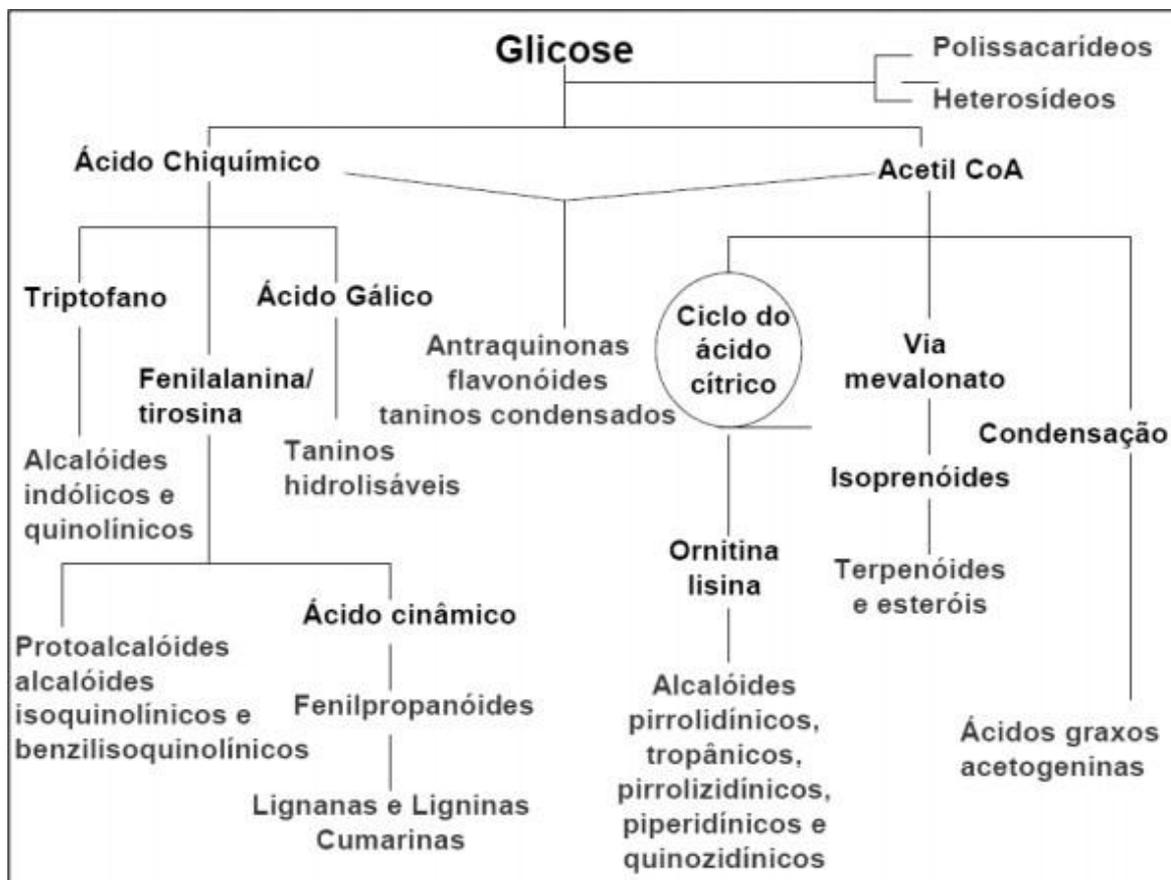
Figura4. Esquema de fatores de influências na síntese de metabólitos secundários



Fonte: Gobbo-Neto; Lopes (2007)

Os metabólitos secundários são produzidos por diversas fontes biossintéticas, sendo as mais importantes a via do ácido chiquímico (fenóis, taninos e alcalóides aromáticos), ácido malônico (fenóis e alcalóides), ácido mevalônico (terpenos, esteróides e alcalóides) e acetyl-coA (polipeptídios), como também podem ser produzidos através de reações anabólicas (FIGURA 5). Para que essas reações biossintéticas aconteçam, é consumida muita energia, obtida através da glicólise e do ciclo do ácido cítrico (GARCIA; CARRIL, 2009; PETROCSKA, 2012).

Figura5. Esquema das vias do metabolismo secundário de plantas



Fonte: Simões (2003)

Estes metabólitos podem ser divididos em três classes químicas diferentes: Os alcalóides, terpenos e compostos fenólicos. I) os alcalóides que são compostos cíclicos com papel importante na formação e maturação das sementes, responsáveis pelo sabor amargo das mesmas, apresentam efeito analgésico e atuam no sistema nervoso central dos seres humanos, porém seu uso inadequado pode conferir ao indivíduo dependência; II) os terpenos que são subdivididos em monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e os tetraterpenos, têm a função de agentes germinadores, responsável pelo aroma e proteção de plantas; e III) os compostos fenólicos que são chamados de flavonóides e são responsáveis pelo sabor, odor, e coloração dos vegetais (VIZZOTO et al., 2010).

2.5.1 Terpenos

O maior grupo de metabólitos secundários é conhecido como terpenos ou terpenóides. São derivados do isopreno (C5) e são classificados em monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40) (DEWICK, 2009). Os terpenos são moléculas formadas por meio de duas rotas metabólicas distintas: rota do ácido mevalônico e rota do 1-desoxilulose 5- fosfato (DXT) (MC MURRY, 2011; TAIZ; ZEIGER, 2004). A estrutura química de um terpeno apresenta dupla ligação, carbono-carbono, sendo reconhecida como hidrocarboneto insaturado, porém se contém oxigênio, é denominado terpenoide (LOMMIS; CROTEAU, 2014); são vários os exemplos de terpenos naturais tais como esqualeno, β -caroteno, entre outros.

Os monoterpenos (C10) são os principais constituintes dos produtos extraídos de plantas e são importantes na indústria farmacêutica, atuando como herbicidas, pesticidas, agentes antimicrobianos e anticarcinogênicos em alimentos, além do seu uso no controle de dores e inflamações (SILVA, 2005). São biodegradáveis, por isso são utilizados no controle de pragas (SILVA, 2008). O terpeno, com maior número de representantes, são os sesquiterpenos (C15), presentes em várias plantas e que possuem atividades bioativas como ação alelopáticas, inibindo o crescimento de raízes e atuam no sistema de defesa das plantas, além de apresentarem atividades fungitóxica, pesticidas e herbicidas (LORENA & BICAS, 2016).

Os monoterpenos e sesquiterpenos apresentam estruturas com a massa molecular menor e volatilidade acentuada, tendo uma grande importância para o aroma de frutas cítricas, ervas, especiarias e condimentos (MENDES-PINTO, 2011; FARKAS; MOHÁCSI-FARKAS, 2014). Os terpenos são encontrados em plantas, e contribuem para o aroma de plantas e frutos. Além, de ser utilizados nas indústrias farmacêuticas e alimentícias (RAVINDRA; KULKARNI, 2015).

2.5.2 Flavonóides

São compostos por anéis aromáticos hidroxilados, podendo ser um ou mais e são responsáveis pela atividade antioxidante de vegetais. Essas substâncias bioativas apresentam propriedades de óxido-redução atuando na absorção e neutralização de radicais livres, possuem elétrons π em sua estrutura que estabilizam o radical formado pela oxidação do fenol (HORST, 2008). Os flavonóides são sintetizados a partir das vias dos fenilpropanóides, que são vias mistas: I) acetato via ácido mevalônico e II) via ácido chiquímico (POZZI, 2007).

A estrutura básica dessa classe é formada por 15 átomos de carbono na forma C6-C3-C6, baseada no núcleo de dois anéis benzênicos (A e B), ligados a um anel pirano (C). Os flavonóides devido a sua variedade estrutural são subdivididos em 6 classes, de acordo com o grau de saturação e oxidação do anel pirano: flavonona, flavonol, flavona, flavonol, antocianidina e isoflavona (BERNARDES, PEÇANHA, OLIVEIRA, 2010; KOIRALA et al., 2016; JOHNSTON, 2015). Esses compostos desempenham um papel essencial para as plantas, atuando como protetor contra agentes oxidantes (raios ultravioletas, poluição ambiental, substâncias químicas presentes). Além de ter um grande potencial antimicrobiano, antioxidante, antiviral, antitumoral, anti-inflamatório, ação antialérgicas, fotoprotetora, atividades contra o desenvolvimento de tumores, anti-hepatotóxica, antiulcerogênica, antiplaquetária, entre outras (LOPES et al. 2000; RAI, 2010; CORDEIRO, 2013; SAVI et al., 2017).

2.5.3 Taninos

Os metabolitos secundários das plantas apresentam um grupo de compostos fenólicos denominados taninos e são definidos como polímeros fenólicos solúveis em água que precipitam proteínas. Esses compostos apresentam alto peso molecular, entre 500 a 3000 Da e contêm grupos hidroxila-fenólicos em quantidade suficiente para permitir a formação de ligações cruzadas estáveis com proteínas (DESHPANDE et al. 1986; MANGAN, 1988; HASLAM, 1989; BUTLER et al., 1984).

A classificação de acordo com sua estrutura química pode ser taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis são ésteres de ácido gálico e elágico glicolisados, obtidos pela rota do chiquimato em que o grupo hidroxila do açúcar é esterificado com os ácidos fenólicos. Os ésteres do ácido hexaidroxidifênico são formados pelo acoplamento oxidativo fenólico de funções galoil catalisados pela enzima tipo lacase fenol oxidase (DEWICK, 2009).

Os taninos são considerados como meio de defesa da planta contra microorganismos (fungos, bactérias e vírus), contra ataques de insetos e herbívoros (TAKECHI et al., 1985; Temmink et al., 1989). Em estudo realizado por Boughdad et al. (1986) observou-se que a alta presença de taninos pode reduzir o desenvolvimento de insetos e larvas. Os taninos apresentam grandes atividades biológicas e farmacológicas, podendo ser citadas: efeito anti-séptico, antimicrobiano, antidiarreico, inibitório da replicação do HIV (inibindo a transcriptase reversa, dificultando a replicação viral), antihelmíntica e antihepatóxica, anti-tumorais, inibição de enzimas, utilizados em algumas intoxicações, no tratamento de feridas, queimaduras e inflamação da pele (MONTEIRO et al., 2005; HASLAM, 1996; YILDIRIM & KUTLU, 2015).

2.6 CAANTIGA

A caatinga (figura 6), 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 (AGRA, et al., 2008; BRASIL, 2014). A caatinga apresenta a 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., 2006). Esta vegetação diversificada,

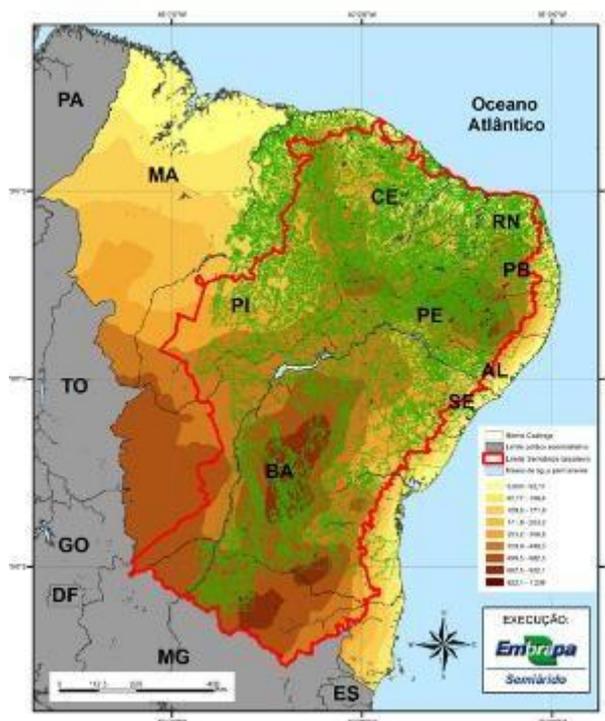
representada por aproximadamente 159 famílias, 1.141 gêneros e 4.547 espécies e dessas, 318 espécies são consideradas endêmicas (AGRA et al., 2008).

As principais famílias encontradas na caatinga, segundo Almeida (2010), são: Leguminosae (278 espécies), Convolvulaceae (103 espécies), Euphorbiaceae (73 espécies), Malpighiaceae (71 espécies), Combretaceae (70 espécies), Poaceae (66 espécies) e Cactaceae (57 espécies). Pesquisas anteriores sobre a caatinga mostram que, além da importância biológica, esse bioma encerra um considerável potencial econômico, com espécies de excelente uso como forragens, frutíferas e medicinais.

O uso popular de plantas medicinais é descrito em uma vasta literatura (ALBUQUERQUE, 2000; ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002; ALMEIDA; ALBUQUERQUE, 2002; CORDEIRO et al, 2015; VIEIRA et al., 2016; SOARES et al., 2016). Estudos têm comprovado a ação de muitas espécies ocorrentes neste bioma com efeito terapêutico comprovado entre a população economicamente mais carente (ALMEIDA; ALBURQUERQUE, 2002; AWAD; AWAAD, 2017). Além disso, as plantas da Caatinga são ricas em compostos ativos como flavonóides, compostos fenólicos, terpenos, taninos, alcalóides e sesquiterpenos.

Mesmo ainda não sendo muito estudado, pesquisas já descreveram diversas atividades biológicas da vegetação da caatinga, tais como: antimicrobiana, anti-inflamatória, antibiofilme, antioxidante e antiparasitária (TRENTIN et al., 2014; SANTOS et al., 2016; PAREDES et al., 2016; VIEIRA et al., 2016; SOARES et al., 2016; ARAÚJO et al., 2017; BONIFACE et al., 2017).

Figura6 – Mapa da localização do bioma Caatinga



Fonte: www.agencia.cnptia.embrapa.br

2.7 FAMILIA 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 15 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; KAPOOR, 2014; SILVA et al., 2015; ALI KHAN et al., 2017).

Os maiores gêneros desta família são: *Combretum*, *Terminalia* e *Quisqualis* (ELOFF, 2008). No Brasil, estima-se a ocorrência de 62 espécies, subordinadas a 5 gêneros; gêneros nativos (*Buchenavia*, *Crombretum*, *Conocarpus*, *Laguncularia* e *Terminalia*) (SOUZA; LORENZI, 2005; MARQUETE; VALENTE, 2006, MARQUETE; LOIOLA, 2015).

Nas Américas, as espécies da família 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 e 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; KAPOOR, 2014; ACHARYYA, 2015; LEE et al., 2017).

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 envolvendo espécies do gênero *Buchenavia* têm evidenciado propriedades antimicrobianas, antioxidantes, anti-biofilmes referentes aos extratos e também aos compostos isolados (OLIVEIRA et al. 2012; CAMARGO; SUFFREDINI, 2014; CAVALCANTI FILHO et al., 2017).

O gênero *Buchenavia* apresenta aproximadamente cerca de 25 espécies, distribuídas desde a América Central até a América do Sul (Venezuela, Colômbia, Guianas, Brasil, Peru e Bolívia). No Brasil está amplamente distribuído entre Norte até sudeste, mas seus representantes são encontrados, principalmente, no Norte com cerca de 20 espécies diferentes. Este gênero é caracterizado por porte arbustivo ou arbóreo, folhas simples e alternas, flores sem pétalas, com frutos do tipo drupa e arredondados (MARQUETE; LOIOLA, 2015). Em relação a atividades biológicas, o gênero apresenta poucos estudos, porém os que são encontrados na literatura mostram a presença de compostos bioativos (alcalóides, flavonóides, taninos e entre outros). Estudos realizados por Cavalcanti-Filho et al. (2017) e Cavalcanti Filho et al. (2016), demonstram

atividades biológicas deste gênero, tais como, atividades antimicrobiana, anti-virulenta e anti-biofilme.

2.8 *Buchenavia tetraphylla*

A *Buchenavia tetraphylla* (figura 7) é um planta da familia Combretaceae, encontrada desde Cuba (América Central) ao Sudeste Brasileiro (América do Sul) (WEAVER, 1991). No Brasil, esta espécie é conhecida porpumente como tanimbuca (FIGURA 12) e está relacionada como uma planta medicinal por comunidades tradicionais (AGRA et al., 2007, 2008). Pesquisa realizada com extratos da folha de *B. tetraphylla*, demonstraram resultados de inibição da replicação do DNA de *Staphylococcus aureus* (DA SILVA et al., 2016).

Em estudos fitoquímicos de *B. Tetraphylla*, verificou-se a presença de hidrocarboretos, açúcar, glicosídeo, terpeno, taninos, flavonoides, carboidratos, protoantocianidinas, leucoantocianidinas e triterpeno (CAVALCANTI-FILHO et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2012). Em pesquisas realizadas por vários autores foram apresentandos resultados frente a micro-organismos patogênicos como *Candida* sp, *Staphylococcus* sp, *Pseudomona* sp, entre outros. Além de exibir baixos efeitos citotóxicos e grande pontecial antioxidante (OLIVEIRA et al., 2012, MOHAMMAD; HASAN; MOHAMED, 2016; AIRES, 2017; CAVALCANTI FILHO et al., 2017).

Figura7 – *Buchenavia tetraphylla*: planta (A) e folhas (B)



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

3 RESULTADOS

3.1 ATIVIDADES ANTIMICROBINA DE BUCHENAVIA TETRAPHYLLA CONTRA ESPECIES DE C. ALBICANS ISOLADAS DE SECREÇÃO VAGINAL.

PHARMACEUTICAL BIOLOGY, 2017
VOL. 55, NO. 1, 1521–1527
<http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2017.1304427>



RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS Check for updates

Antimicrobial activity of *Buchenavia tetraphylla* against *Candida albicans* strains isolated from vaginal secretions

José Robson Neves Cavalcanti Filho^a, Tiago Fonseca Silva^{a,b}, Woah Queiroz Nobre^b, Larissa Isabela Oliveira de Souza^c, Cristiane Santos Silva e Silva Figueiredo^d, Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo^c, Norma Buarque de Gusmão^e, Márcia Vanusa Silva^a, Luís Cláudio Nascimento da Silva^{b,d} and Maria Tereza dos Santos Correia^{a*}

^aDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil; ^bCurso de Farmácia, Faculdade Pernambucana de Saúde, Recife, Brasil; ^cCentro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Recife, Brasil; ^dPrograma de Pósgraduação, Universidade CEUMA, Sao Luis, Brasil; ^eDepartamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil

ABSTRACT

Context: *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) RA Howard (Combretaceae: Combretoidae) is an ethnomedicinal plant with reported antifungal action.

Objective: This study evaluates the antimicrobial activity of *B. tetraphylla* leaf extracts against clinical isolates of *Candida albicans*. The morphological alterations, combinatory effects with fluconazole and the cytotoxicity of the active extract were analyzed.

Materials and methods: Extracts were obtained using different solvents (hexane: BTHE; chloroform: BTCE; ethyl acetate: BTEE; and methanol: BTME). Antimicrobial activity was determined by the broth microdilution method using nine strains of *C. albicans* isolated from vaginal secretions and one standard strain (UFPEDA 1007).

Results: All extracts showed anti-*C. albicans* activity, including against the azole-resistant strains. The MIC values ranged from 156 to 2500 µg/mL for the BTHE; 156 to 1250 µg/mL for the BTCE; 625 to 1250 µg/mL for the BTME and 625 µg/mL to 2500 µg/mL for the BTEE. BTME showed the best anti-*C. albicans* activity. This extract demonstrated additive/synergistic interactions with fluconazole. Scanning electron microscopy analysis suggested that the BTME interferes with the cell division and development of *C. albicans*. BTME showed IC₅₀ values of 981 and 3935 µg/mL, against J774 macrophages and human erythrocytes, respectively. This extract also enhanced the production of nitric oxide by J774 macrophages.

Discussion and conclusion: *Buchenavia tetraphylla* methanolic extract (BTME) is a great source of antimicrobial compounds that are able to enhance the action of fluconazole against different *C. albicans* strains; this action seems related to inhibition of cell division.

ARTICLE HISTORY

Received 15 April 2016
Revised 25 January 2017
Accepted 3 March 2017

KEYWORDS

Antifungal agents; natural products; Caatinga biome

Introduction

Candida albicans is a polymorphic fungus recognized as one of the most common fungal pathogens, responsible for a range of diseases (Mayer et al. 2013). This yeast is usually found in the normal microbiota of several distinct anatomical sites such as skin, mouth and genitourinary and digestive systems (Pfaller & Diekema 2010; Gulati & Nobile 2016). However, some adverse environmental conditions such as pH shift, nutritional deficiency, use of antibiotics or variations in the immune status of the host, can enable this microorganism to cause infections, which range from superficial dermal and mucosal cases to more severe systemic infections (candidemia and invasive candidiasis, frequently associated with patients with compromised immunity). Several factors, related to both host and pathogen, are recognized as crucial for infection development; for example, *C. albicans* possesses a range of virulence factors, associated to adherence, filamentation, biofilm formation and secretion of proteases. Additionally, antibiotic and immunosuppressive therapies, diseases (human immunodeficiency virus, diabetes), and aging are also factors that

favour *C. albicans* infections (Gow & Hube 2012; Mayer et al. 2013; Fadda et al. 2015).

The treatment of *C. albicans* infection is based on the use of systemic antifungals (fluconazole or itraconazole) and topical nystatin (Pappas et al. 2015). An increase in the resistance of *C. albicans* to antifungals has been observed in recent decades, which makes this yeast a serious concern for the global health system. Indeed, the development of new and effective approaches to treat fungal infections remains one of the major challenges for modern medicine (Sardi et al. 2013).

Traditional medicinal plants from underexploited environments, such as the Caatinga (semi-arid region), an exclusively Brazilian biome, have been the subject of various studies in the search for new antimicrobial compounds, due to their exceptional activity against microorganisms (Oliveira et al. 2012; Silva et al. 2014). *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) RA Howard (Combretaceae: Combretoidae) is a Neotropical plant, distributed from Cuba (Caribbean) to Brazil (South America) (Weaver 1991). In Brazil, this plant is popularly known as 'Tanimbuca'

CONTACT Luís Cláudio Nascimento da Silva luisclaudionsilva@yahoo.com.br Universidade CEUMA, Sao Luis, Brasil

*These authors have contributed equally to this work.

© 2017 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

and is listed as an ethnomedicinal plant used by the traditional communities of northeastern Brazil (Agra et al. 2007, 2008). Our group has shown that extracts and fractions of *B. tetrrophylla* leaves have a broad-spectrum of antimicrobial activities, inhibiting both Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi (including *C. albicans*) (Oliveira et al. 2012). Additionally, a recent study has shown that *B. tomentosa* had a potential antifungal effect against different *Candida* species (Teodoro et al. 2015). In this context, this study aimed to evaluate the antimicrobial activity of *B. tetrrophylla* extracts alone or in combination with fluconazole against clinical isolates of *C. albicans* isolated from vaginal secretions, and to analyze the ultrastructural changes and the combinatory effect with fluconazole induced by the active extract.

Materials and methods

Plant material: collection, identification and extraction

Leaves of *B. tetrrophylla* were collected in the *Parque Nacional do Catimbau* (PARNA do Catimbau, Pernambuco, Brazil) in November of 2013. The taxonomic identification was performed by Dr Alexandre Gomes da Silva, at the Herbarium of the Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA), where the voucher specimen (Number 84.104) was deposited. Leaves were dried using an incubator at 45 °C for 2 to 3 days. The dried material was ground into powder form using a grinder followed by a Waring blender.

For extraction, dried leaves (25 g) were mixed with hexane (100 mL) in a shaker at 125 rpm for 72 h at 25 °C. Then, the extract was filtered and the supernatant was concentrated in a rotary vacuum. The residue was suspended in 100 mL of chloroform. The extraction procedure was repeated and the residue was resuspended in 100 mL of ethyl acetate. Finally, the residue was subjected to methanol extraction. All extract samples were diluted in 100% dimethyl sulfoxide and stored at 4 °C prior to use.

Phytochemical analysis

The extracts from *B. tetrrophylla* were submitted to thin-layer chromatography (TLC) assays in order to perform a qualitative detection of their functional compounds. The extracts were loaded in silica gel F254 + 366 plates (20 × 20 cm; <AQ5>), and developed in a solvent system: A (toluene/dioxan/acetic acid, 180:45:5, v/v) and B (hexane/diethyl ether/formic acid, 130:80:20, v/v). Bands were revealed under UV light (254/365 nm), using ceric sulphate and ferric chloride. The bands were identified by their R_f values and compared with the standards used.

Antimicrobial assays

Candida albicans strains

A total of 10 *C. albicans* strains were used in this study. The standard strain (UFPEDA1007) was obtained from the Microbial Collection of the *Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco* (UFPEDA). The clinical strains were isolated from vaginal secretions at different clinical laboratories in Recife (Pernambuco, Brazil) and kindly provided by them between September and December 2012.

The antibiotic-susceptibility profile of each isolate was performed according to the CLSI recommendations (CLSI 2011) using the disc-diffusion assay on Sabouraud dextrose agar (SDA). In brief, colonies from overnight cultures of *C. albicans* were suspended in sterile saline water equivalent to a 0.5 McFarland standard.

Table 1. Antibiotic-resistance profile of *C. albicans* clinical strains isolated from vaginal secretion samples.

Strain	Amphotericin B	Ketoconazole	Fluconazole	Itraconazole
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
F14	S	S	I	I
F22	S	S	I	I
F23	S	S	S	S
F27	S	S	I	I

Interpretation of IDZ values (mm) (CLSI, 2011)

Drugs	Sensitive (S)	Intermediate (I)	Resistant (R)
Amphotericin B	≥15	14–10	<10
Ketoconazole	≥28	27–21	≤20
Fluconazole	≥19	18–15	≤15
Itraconazole	≥23	22–14	<13

The suspension (100 µL) was spread over an SDA plate and the antibiotic disc was applied aseptically onto the surface. Afterwards, the plates were incubated at 30 °C for a period of 48 h and then each inhibition diameter zone (IDZ) was measured and interpreted as shown in Table 1. The antibiotics used were amphotericin B, fluconazole, itraconazole and ketoconazole.

The multiple antibiotic resistance (MAR) index was calculated as previously described by Krumperman (1983) using the formula $MAR = x/y$, where 'x' is the number of antibiotics to which the isolate demonstrated resistance; and 'y' is the total number of antibiotics tested.

Determination of minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC)

The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined by the microdilution method (CLSI 2011). Twofold serial dilution of each extract was prepared in Sabouraud broth and 10 µL of yeast suspension (approximately 1.5×10^8 CFU/mL) were added. The microplates were incubated at 30 °C. After 48 h, 50 µL of resazurin solution (0.01%) were added to each well. The plates were re-incubated for 2 h at 30 °C, and any colour changes from purple to pink was recorded as microbial growth. The lowest concentration at which no colour change occurred was taken as the MIC. Afterwards, cultures were seeded in SDA plates and incubated for 48 h at 30 °C to determine the minimum fungicidal concentration (MFC).

Combinatory effects of *B. tetrrophylla* methanolic extract and fluconazole

The combinatory effects of the BTME and fluconazole were evaluated against five *C. albicans* strains (F03, F08, F11, F22, 1007). Both samples were added to microplates containing SAB and a twofold serial dilution was prepared (5000 to 98 µg/mL for BTME and 100 to 0.2 µg/mL for fluconazole). The antimicrobial action was evaluated as described for MIC, and after 48 h, the drug/extract interaction was assessed algebraically by determining the Fractional Inhibitory Concentration indices (ΣFIC), according to the following equation:

$$\Sigma FIC = (MIC_E + F/MIC_E) + (MIC_F + E/MIC_F)$$

MIC_E or MIC_F: the MIC extract or MIC fluconazole; MIC_{F+E}: the MIC_E when in combination with fluconazole; MIC_{D+F}: the MIC of fluconazole when in combination with extract; Data interpretation: ΣFIC ≤0.5: synergism (syn);

$0.5 < \Sigma FIC \leq 1$: addition (add); $1 < \Sigma FIC < 4$: non-interaction (non); $\Sigma FIC \geq 4$: antagonism (ant) (Vuuren & Viljoen 2011).

Scanning electron microscopy (SEM)

To evaluate the morphological changes induced by the BTME extract, a sample of 100 μ L of a diluted overnight culture of *C. albicans* (approximately 1.5×10^8 CFU/mL) was added to 1 mL of SAB and mixed with the BTME (MIC). After incubation (12 h at 30 °C) the cells were treated as described by da Silva et al. (2013) and imaged with a Quanta 200F scanning electron microscope (FEI company).

Determination of nitric oxide production and cell viability in macrophages

J774 macrophages (1×10^5 cells/mL) were seeded in a 96-wells plate for 24 h at 37 °C and 5% CO₂ and then treated with the BTME (156–2500 μ g/mL) for another 24 h. After the treatment, the supernatant was used to determine nitric oxide (NO) production, and the adherent cells were used for viability assays. For NO determination, the supernatant (100 μ L) from each well was mixed with 100 μ L of Griess reagent in a 96-wells plate. After incubation for 15 min at room temperature, the optical density was determined at 540 nm with a microplate reader (Benchmark plus, Bio-Rad, Hercules, CA). The nitrite content (μ M/ 10^6 cells) was quantified by extrapolation from sodium nitrite standard curve in each experiment. Cell viability was evaluated using the MTT assay, which measures the metabolic conversion of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) salt by mitochondria of viable cells, by the use of coloured formazan dye. At the end of the incubation, the medium was removed and an MTT solution (5000 μ g/mL in RPMI) was added to the cells that were further incubated for 3 h. Afterwards, the medium was removed and the intracellular formazan product was dissolved in DMSO. Optical density (OD) was measured at 595 nm. Cell viability was calculated in comparison to the OD obtained by untreated cells.

Haemolytic assay

Blood (5–10 mL) samples were obtained from healthy volunteers by venipuncture and placed in heparinized tubes, after written informed consent was obtained. Human erythrocytes were isolated by centrifugation (1500 rpm for 10 min) and washed three times with phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4). Each test tube received 1.1 mL of erythrocyte suspension (1%) and 0.4 mL of the various extracts at different concentrations (156–2500 μ g/mL). Cells incubated in PBS or in a solution of saponin from *Quillaja* sp. (0.0025%) were used as negative and positive controls for haemolytic activity, respectively. After 60 min of incubation, cells were centrifuged and the absorbance of supernatant was read at 540 nm. The haemolytic activity was expressed by the following formula:

$$\text{Haemolytic activity (\%)} = (A_s - A_b) \times 100 / (A_c - A_b)$$

A_b = solvent absorbance, A_s = sample absorbance; A_c = saponin absorbance.

Statistical analysis

All experiments were performed in quadruplicate with at least two independent experiments. Results are expressed as

Table 2. Phytochemical analysis of *B. tetraphylla* leaves extracts.

Phytochemical compounds	Extract			
	BTHE	BTEE	BTCE	BTME
Hydrocarbons	+	+	-	-
Sugars	+	-	+	-
Glycosides	+	-	-	-
Terpenes	+	+	+	-
Flavonoids	-	+	-	+
Tannins	-	+	-	+

BTHE: *Buchenavia tetraphylla* extracts hexane; BTEE: *B. tetraphylla* extracts Ethyl acetate; BTCE: *B. tetraphylla* extracts Chloroform; BTME: *B. tetraphylla* extracts Methanol.

mean \pm standard deviation (SD). Statistical analyses were performed by Student's *t* test. All analyses were carried out using the Statistica 8.0 software. Differences were considered significant at $p < 0.05$. The correlation indices were calculated using the Pearson coefficient (ρ).

Results

Phytochemical analysis

The phytochemical profile of extracts from leaves of *B. tetraphylla* is shown in Table 2. The results showed that all extracts have at least one class of compound reported as an antimicrobial agent. The hexane extract (BTHE) presented hydrocarbons, glycosides, sugar and terpenes. Flavonoids, terpenes and tannins were detected in the ethyl acetate extract (BTEE), while only terpenes and sugar were found in the chloroform extract (BTCE). Finally, flavonoids and tannins were detected in the methanol extract (BTME).

Antibiotic susceptibility of *C. albicans* strains

All clinical isolates of *C. albicans* tested in this study had their antibiotic-susceptibility profile analyzed (Table 1). According to the disc-diffusion assay, two strains (F03 and F23) were susceptible to all tested antifungal agents; another three isolates (F14, F23 and F27) were susceptible to amphotericin B and ketoconazole and showed intermediate susceptibility to fluconazole and itraconazole; the strain F01 was only resistant to amphotericin B; finally, the strains F02, F08 and F11 showed resistance to fluconazole with cross-resistance to itraconazole (MAR index of 0.5). Fluconazole resistance of each strain was confirmed by MIC determination as recommend by CLSI (CLSI 2011). Strains F03, F08 and 1007 were inhibited by fluconazole at 3.125 μ g/mL, while strains F11 and F22 were inhibited by the same drug at 6.25 μ g/mL.

Anti-*C. albicans* action of *B. Tetraphylla* extracts

The inhibitory action of *B. tetraphylla* extracts was evaluated against 10 *C. albicans* strains (Table 3). The extracts showed anti-*C. albicans* activity against all tested strains, including theazole-resistant strains (F02, F08 and F11). The MIC values ranged from 156 to 2500 μ g/mL for the BTHE; 156 to 1250 μ g/mL for the BTCE; 625 to 1250 μ g/mL for the BTME and 625 μ g/mL to 2500 μ g/mL for the BTEE. The BTME and BTCE showed the best antimicrobial potential with no significant difference between their average MFC values ($p > 0.05$). A moderate negative correlation was observed between the MAR indexes of all strains and MIC ($\rho = -0.39$) or MFC ($\rho = -0.33$) values of the

Table 3. The anti-*Candida albicans* activity of extracts from *B. tetraphylla* leaves.

C. albicans strains	MAR index	B. tetraphylla extracts											
		Ethyl acetate			Chloroform			Hexane			Methanol		
		MIC ^a	MFC ^a	MFC/MIC	MIC ^a	MFC ^a	MFC/MIC	MIC ^a	MFC ^a	MFC/MIC	MIC ^a	MFC ^a	MFC/MIC
F01	0.25	1250	>5000	>4	625	5000	8	625	1250	2	625	1250	2
F02	0.5	1250	5000	4	1250	2500	2	2500	5000	2	625	2500	4
F03	0	2500	>5000	>2	625	2500	4	625	2500	4	1250	2500	2
F08	0.5	625	>5000	>8	625	1250	2	1250	5000	4	625	1250	2
F11	0.5	1250	2500	2	625	1250	2	156	1250	8	625	1250	2
F14	0	625	5000	8	625	1250	2	625	>5000	>8	625	1250	2
F22	0	1250	5000	4	625	2500	4	1250	2500	2	625	2500	4
F23	0	2500	5000	2	625	1250	2	1250	2500	2	1250	2500	2
F27	0	625	1250	2	625	1250	2	1250	2500	2	625	2500	4
UFPEDA 1007	0	625	2500	4	156	312	2	1250	5000	4	625	1250	2
Average MIC		1250 ± 721 µg/mL			641 ± 260 µg/mL			1078 ± 636 µg/mL			750 ± 264 µg/mL		
Average MFC		4125 ± 1450 µg/mL			1096 ± 1305 µg/mL			3250 ± 1581 µg/mL			1875 ± 659 µg/mL		

^aMIC e MMC is expressed at µg/mL; MAR index: multiple antibiotic resistance index; UFPEDA: Microbial Collection of the Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco.

BTME, indicating this extract was slightly more active against the resistant strains. Moderate and weak positive correlations were found between the MAR indexes and MIC ($\rho = 0.51$) or MFC ($\rho = 0.14$) values of the BTCE. Additionally, the MFC/MIC ratios ranged from 2 to 4 for the BTME, thus it was a fungicidal agent against all tested strains. Both fungicidal and fungistatic effects were observed for the BTCE (MFC/MIC ratios ranged from 2 to 8), but fungicidal action was more prominent (for nine strains). Since the BTME showed the strongest activity it was chosen for further biological activity assays.

Combinatory effects of the BTME and fluconazole

The combinatory effects of the BTME and fluconazole are shown in Figure 1. The extract had the ability to increase the action of fluconazole in most strains through additive (20% of strains; $\Sigma\text{FIC} = 0.75$) or synergistic (60% of strains; ΣFIC values of 0.375 and 0.5) effects. Non-interaction was observed against one strain ($\Sigma\text{FIC} = 2$).

Morphological changes induced by the BTME

The morphological alterations induced by the BTME in the fluconazole-resistant F08 strain were evaluated using scanning electron microscopy. This strain was chosen because it presents a high degree of cell surface hydrophobicity *in vitro* (data not shown), a property related to the increase of *C. albicans* adherence and virulence (Blanco et al., 2009; Silva-Dias et al. 2015). After 12 h of cultivation, untreated samples (Figures 2(a-c)) showed a predominance of budding blastoconidial cells with a normal elliptical shape, smooth surface and formation of hyphal structures exhibiting a homogeneous, elongated shape without constrictions (Figure 2(a)). BTME-treated cells (Figures 2(d-f)) showed intense deposition of flocculated material on the cell surface, more elongated blastoconidial morphology with several scars (Figure 2(e)). However, no filamentation could be observed and hyphal structures were not seen in treated samples. Cells presenting depressions on the cell surface could also be observed (Figure 2(f)). No ruptured cells or alterations on the yeast cell surface were detected.

Effects of the BTME on cell viability and NO production

The treatment of J774 macrophages with different concentrations of the BTME resulted in significant production of NO at

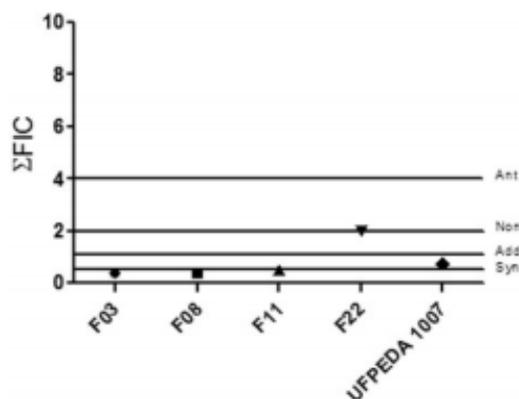


Figure 1. Combinatory effects of BTME and fluconazole against *Candida albicans*. non: non-interactive effect; add: additive effect; syn: synergistic effect; ant: antagonistic effect.

concentrations from 312.5 to 2500 µg/mL ($p > 0.05$), in a dose-dependent manner (Figure 3). Regarding cytotoxicity, the BTME extract showed IC_{50} values of 981 µg/mL against J774 macrophages and 3935 µg/mL against erythrocytes.

Discussion

C. albicans is the most prevalent pathogen associated with vulvovaginal candidiasis, and it is estimated that it affects approximately 75% of women at least once during their lifetime. This pathology represents significant health issues for women of child-bearing age, as well as diabetic and immuno-deficient patients. Vulvovaginal candidiasis is associated with considerable morbidity, increased healthcare costs, distress, pain and sexual dysfunction (Cassone 2014). *C. albicans* strains isolated from vaginal secretions have shown increased resistance towards antifungal agents, especially fluconazole. It is important to highlight that the breakpoint of *in vitro* susceptibility for strains isolated from vaginal secretions has been suggested to be 1 µg/mL instead of 8 µg/mL, this is due to the specific pharmacokinetic characteristics of the vagina (Sobel et al. 2003; Marchaim et al. 2012). In this context, this work evaluated the antifungal action of extracts from leaves of *B. tetraphylla* against fluconazole-resistant and fluconazole-sensitive strains of *C. albicans* isolated from human vaginal secretions.

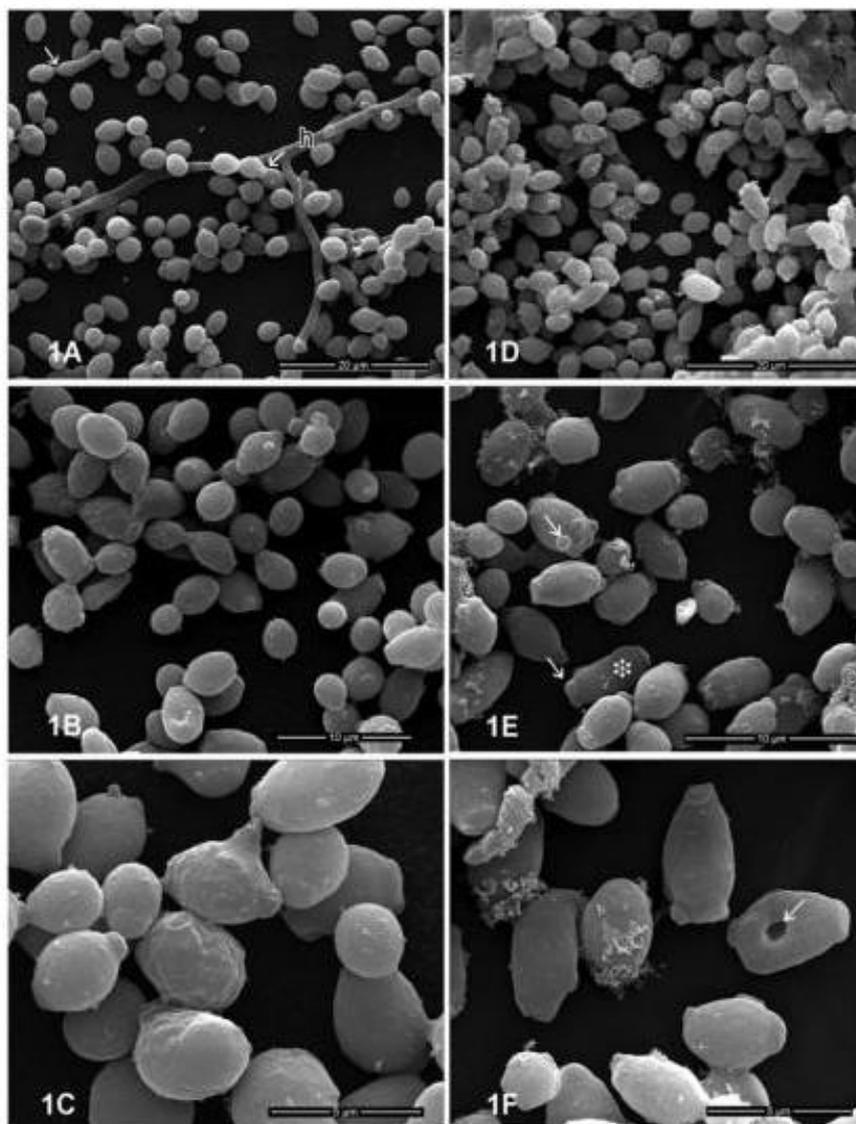


Figure 2. Effects of BTME on *C. albicans*. (a–c) Control cells; (d–f) cells treated with BTME at MIC for 12 h. (a–c) Ultrastructural aspects of untreated *C. albicans* culture at low (a) and high magnification (b–c) showing the presence of single and budding yeast cells with evident fragile blastoconidial septum (white arrow). (h) True hyphal structures could be also observed. Treated *C. albicans* culture at (d) low and (e–f) high magnifications. Note in (e) the presence of elongated cells (white asterisk) with multiple scars (white arrow). (f) Cells presenting surface depressions are indicated in white arrow.

It has been reported that *B. tetraphylla* leaves are a source of compounds with anti-*C. albicans* activity (Oliveira et al. 2012). Furthermore, Teodoro et al. (2015) found remarkable anti-*Candida* activity of another member of the *Buchenavia* genus, *B. tomentosa*. All the extracts were also effective against the clinical isolates tested. Furthermore, the extraction method used in this present paper increased the antifungal potential of this plant, as the average MIC values of the standard strain were up to 40 times lower than those reported by Oliveira et al. (2012). Among the extracts, the BTME and BTCE showed the best activity and no significant differences were observed between their MIC or MFC values. The BTME is more effective against

the fluconazole-resistant strains than the BTCE, as confirmed by correlation analysis (the Pearson coefficient for their MIC values was -0.032 ; and 0.076 for their MFC values). Two mammalian cell types were used to determine the cytotoxic potential of each extract: human erythrocytes and mice macrophages. Both models are widely used to assess the toxicity of plant-derived products (Oliveira et al. 2012; Santos Aliança et al. 2014; Sant'Anna da Silva et al. 2016). In the cytotoxicity assays, the BTME showed IC_{50} values of 981 and $3935 \mu\text{g/mL}$ against J774 macrophages and human erythrocytes, respectively. These values are higher than the average MIC of the BTME ($625 \mu\text{g/mL}$). Therefore, it was decided to evaluate the morphological changes

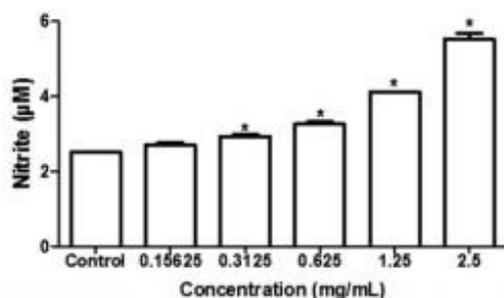


Figure 3. Effect of BTME on nitric oxide production by J774 macrophages. *Significant differences in relation to control ($p < 0.05$).

induced by the BTME and its effects when in combination with fluconazole.

Fluconazole is recommended as the first choice for treating pathologies caused by *C. albicans*, mainly due to its high efficiency and good pharmacokinetic properties (Pappas et al. 2015). However, the appearance of fluconazole resistance represents an enormous limitation for its use in the treatment of candidiasis (Morschhäuser 2016). Consequently, combination therapy has been indicated as a useful alternative to manage *Candida* infections (Cui et al. 2015). Measurement of the combinatory effects of natural products and antimicrobial agents has been taken as a new strategy in the battle against drug resistance (Hemaiswarya et al. 2008; Wagner & Ulrich-Merzenich 2009; Cui et al. 2015) and a range of plant-derived products have been used to increase or restore the action of some antifungal agents such as fluconazole (Khan & Ahmad 2012; Avijgan et al. 2014; da Silva et al. 2014). The BTME was able to increase fluconazole activity against the five resistant strains by additive and synergetic effects. Compounds from both flavonoid and tannin classes (same classes detected in the BTME) are reported as enhancers of fluconazole activity (Endo et al. 2010; da Silva et al. 2014).

Depending on environmental conditions, *C. albicans* can assume three different morphotypes during its development: blastoconidial, pseudohyphal and hyphal forms. Furthermore, *C. albicans* easily develops into a biofilm on surfaces, which when compared to planktonic cells, displays stronger resistance to a wide variety of antifungal agents (Staniszewska et al. 2012; Ma et al. 2015). Different from the control cells, morphological observation showed a predominance of single, isolated blastoconidia over the budding cells and no true hyphal development. These results suggest that the BTME substantially affected the morphogenetic transition of *C. albicans*, which is crucial to its virulence (Staniszewska et al. 2012). The ability to produce hyphae (and then switch between yeast and filamentous forms) is of extreme importance to the pathogenesis of candidiasis and is considered the central virulence attribute (Berman & Sudbery 2002; Dalle et al. 2010; Mayer et al. 2013). The yeast-to-hyphae transition is related to tissue damage and invasion and the host inflammatory response, as well as mediating *Staphylococcus aureus* co-infection (Peters et al. 2014; Schlecht et al. 2015). The ability of the BTME to inhibit hyphal formation can be considered an attractive characteristic for anti-*C. albicans* therapy, especially during biofilm formation (Jacobsen et al. 2012).

Finally, the BTME induced the significant production of NO from macrophages. NO is a reactive oxygen nitrogen species which is recognized as a marker of macrophage activation, playing an essential role in antimicrobial defence. Specifically, NO suppression is a mechanism used by *C. albicans* to evade the

immune system response, thus macrophage function modulation is a potential aim for antifungal therapy (Collette et al. 2014).

In conclusion, this study demonstrated that *B. tetraphylla* is a great source of antimicrobial compounds able to enhance the action of fluconazole against different *C. albicans* strains. The methanol extract induced significant morphological changes in treated cells and enhanced NO production *in vitro*. Therefore, it is presented as a promising source of antifungal agent(s) for the treatment of *C. albicans*. The identification, molecular and *in vivo* studies of the active substance(s) will be areas of important future research aimed at finding alternative, new strategies for controlling *C. albicans* infections using natural products from the Caatinga.

Acknowledgements

The authors are grateful to the following Brazilian agencies: the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (CAPES).

Disclosure statement

The authors confirm that there is no conflict of interest in this article content.

Funding

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [10.13039/501100003593], Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior [10.13039/501100002322], Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco [10.13039/501100006162].

ORCID

Luís Cláudio Nascimento da Silva  <http://orcid.org/0000-0002-4206-0904>

References

- Agra MF, Baracho GS, Silva KN, Basílio JLD, Coelho VPM. 2007. Medicinal and poisonous diversity of the flora of Cariri Paraíba, Brazil. *J Ethnopharmacol.* 111:383–395.
- Agra MF, Silva KN, Basílio JLD, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. 2008. Survey of medicinal plants used in the region northeast of Brazil. *Braz J Pharmacog.* 18:472–508.
- Avijgan M, Mahboubi M, Nasab MM, Nia EA, Yousefi H. 2014. Synergistic activity between *Echinophora platyloba* DC ethanolic extract and azole drugs against clinical isolates of *Candida albicans* from women suffering chronic recurrent vaginitis. *J Mycol Med.* 24:112–116.
- Berman J, Sudbery PE. 2002. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet.* 3:918–932.
- Blanco MT, Sacristán B, Lucio L, Blanco J, Pérez-Giraldo C, Gómez-García AC. 2009. Cell surface hydrophobicity as an indicator of other virulence factors in *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol.* 27:195–199.
- Cassone A. 2014. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects. *BJOG.* 122:785–794.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (21st edn) Wayne: M100-S21. Clin Lab Std Inst. 30.
- Collette JR, Zhou H, Lorenz MC. 2014. *Candida albicans* suppresses nitric oxide generation from macrophages via a secreted molecule. *PLoS One.* 9:e96203.

- Cui J, Ren B, Tong Y, Dai H, Zhang L. 2015. Synergistic combinations of antifungals and anti-virulence agents to fight against *Candida albicans*. *Virulence*. 6:362-371.
- da Silva CR, de Andrade Neto JB, de Sousa Campos R, Figueiredo NS, Sampaio LS, Magalhães HI, Cavalcanti BC, Gaspar DM, de Andrade GM, Lima IS, et al. 2014. Synergistic effect of the flavonoid catechin, quercetin, or epigallocatechin gallate with fluconazole induces apoptosis in *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 58:1468-1478.
- Dalle F, Wächtler B, L'Ollivier C, Holland G, Bannert N, Wilson D, Labrière C, Bonnin A, Hube B. 2010. Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cell Microbiol*. 12:248-271.
- Endo EH, Cortez DAG, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Dias Filho BP. 2010. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. *Res Microbiol*. 161:534-540.
- Fadda ME, Podda GS, Pisano MB, Deplano M, Cosentino S. 2015. Prevalence of *Candida* species in different hospital wards and their susceptibility to antifungal agents: results of a three-year survey. *J Prev Med Hyg*. 49:69-74.
- Gow NA, Hube B. 2012. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Curr Opin Microbiol*. 15:406-412.
- Gulati M, Nobile CJ. 2016. *Candida albicans* biofilms: development, regulation and molecular mechanisms. *Microbes Infect*. 16:1-30.
- Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M. 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*. 15:639-652.
- Jacobsen ID, Wilson D, Wächtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. 2012. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 1:85-93.
- Khan MAS, Ahmad I. 2012. Antibiofilm activity of certain phytochemicals and their synergy with fluconazole against *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 67:618-621.
- Krumpalman PH. 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl Environ Microbiol*. 46:165-170.
- Ma C, Du F, Yan L, He G, He J, Wang C, Rao G, Jiang Y, Xu G. 2015. Potent activities of roemerine against *Candida albicans* and the underlying mechanisms. *Molecules*. 20:17913-17928.
- Marchaim D, Lemanek L, Bheemreddy S, Kaye KS, Sobel JD. 2012. Fluconazole-resistant *Candida albicans* vulvovaginitis. *Obstet Gynecol*. 120:1407-1414.
- Mayer FL, Wilson D, Hube B. 2013. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 4:119-128.
- Morschhäuser J. 2016. The development of fluconazole resistance in *Candida albicans* - an example of microevolution of a fungal pathogen. *J Microbiol*. 54:192-201.
- Oliveira YLC, Silva LCN, Silva AG, Macedo AJ, Araújo JM, Correia MTS, Silva MV. 2012. Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. Howard (Combretaceae: Combretaceae). *Sci World J*. 2012:1-6.
- Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, Zaoutis TE. 2015. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 62:e1-50.
- Peters BM, Palmer GE, Nash AK, Lilly EA, Fidel PL, Noverr MC. 2014. Fungal morphogenetic pathways are required for the hallmark inflammatory response during *Candida albicans* vaginitis. *Infect Immun*. 82:532-543.
- Pfaller MA, Diekema DJ. 2010. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol*. 36:1-53.
- Sant'Anna da Silva AP, Nascimento da Silva LCN, Martins da Fonseca CS, de Araújo JM, Correia MT, Cavalcanti MS, Lima VL. 2016. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of organic extracts from *Cleome spinosa* Jacq. *Front Microbiol*. 7:963.
- Santos Aliança AS, Anjos KF, Vasconcelos Reis TN, Higino TM, Brelaz-de-Castro MC, Bianco ÊM, Figueiredo RC. 2014. The *in vitro* biological activity of the Brazilian brown seaweed *Dictyota mertensii* against *Leishmania amazonensis*. *Molecules*. 19:14052-14065.
- Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Giannini MM. 2013. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*. 62:10-24.
- Schlecht LM, Peters BM, Krom BP, Freiberg JA, Hänsch GM, Filler SG, Shirliff ME. 2015. Systemic *Staphylococcus aureus* infection mediated by *Candida albicans* hyphal invasion of mucosal tissue. *Microbiology (Reading, Engl)*. 161:168-181.
- Silva LCN, Sandes JM, Paiva MM, Araújo JM, Figueiredo RCBQD, da Silva MV, Correia MTDS. 2013. Anti-*Staphylococcus aureus* action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. *Nat Prod Res*. 27:1492-1496.
- Silva LN, Trentin DDS, Zimmer KR, Treter J, Brandelli CLC, Frasson AP, Macedo AJ. 2014. Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation. *Pharm Biol*. 53:464-468.
- Silva-Dias A, Miranda IM, Branco J, Monteiro-Soares M, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. 2015. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. *Front Microbiol*. 6:1-8.
- Sobel JD, Zervos M, Reed BD, Hooton T, Soper D, Nyirjesy P, Panzer H. 2003. Fluconazole susceptibility of vaginal isolates obtained from women with complicated *Candida vaginitis*: clinical implications. *Antimicrob Agents Chemother*. 47:34-38.
- Staniszewska M, Bondaryk M, Siennicka K, Kurzatkowski W. 2012. Ultrastructure of *Candida albicans* pleomorphic forms: phase-contrast microscopy, scanning and transmission electron microscopy. *Pol J Microbiol*. 61:129-135.
- Teodoro GR, Brighenti FL, Delbem ACB, Delbem ÁCB, Khouri S, Gontijo AVL, Koga-Ito CY. 2015. Antifungal activity of extracts and isolated compounds from *Buchenavia tomentosa* on *Candida albicans* and non-*albicans*. *Future Microbiol*. 10:917-927.
- Vuuren SV, 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. 2009. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*. 16:97-110.
- Weaver PL. 1991. *Buchenavia tetraphylla* (Vahl.) Eichler: Granadillo. New Orleans (LA): Department of Agriculture, Southern Forest Experiment Station.

Microbes in the spotlight: recent progress in the understanding of beneficial and harmful

Microbes in the spotlight: recent progress in the understanding of beneficial and harmful

Microbes in the spotlight: recent progress in the understanding of beneficial and harmful

3.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO EXTRATO METANÓLICO DA *B. tetraphylla*.

Biological activities of methanolic extract of *Buchenavia tetraphylla*

J.R.N. Cavalcanti Filho^{*:1,2}, K.P.M. Silva², L.M. Cruz¹, T.F. Silva¹, B.S. Santos¹, F.V.F. Arruda²,

M.C.V. Vicalvi-Costa², N.B. Gusmão², M.V. Silva¹, L.C. N. Silva³ and M.T. S. Correia¹

¹ Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, 50670-420 Recife, Pernambuco, Brazil

² Department of Antibiotics, Biological Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rêgo, S/n Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE, Brazil

³ Functional Genomic, Department of Biology, Faculty of Science, University of Copenhagen. Ole Maaloes Vej 5, 2200, Copenhagen, Denmark

* Corresponding author: e-mail: robsonncavalcanti@gmail.com; Phone: +55997930302

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial and antivirulence activities of the methanolic extract from leaves of *Buchenavia tetraphylla* against *Candida albicans*. The antimicrobial activity was assayed through determination of minimum inhibitory and microbicidal concentrations (MIC and MMC) by broth microdilution method (using 10 strains of *C. albicans*). The antivirulence properties were evaluated by traditional antibiofilm and anti-hyphae assays. The MIC values ranged from 0.078125 mg/mL to 1.25 mg/mL; and CMM of 0.15625 mg/mL to 2.5 mg/mL. At sub-inhibitory concentrations (MIC/2 and MIC/4), a strong reduction in the biofilm formation was observed. Finally, the extract was able to totally inhibit the hyphae formation of two strains (UFPEDA1007 and F08). Thus, these results provide new insights into the biotechnological potential of *B. tetraphylla*, encouraging future researches regarding the identification of active (s) compound (s), and determination of action mechanisms and pharmacological aspects. All these actions will support the use of *B. tetraphylla* derived compounds as antimicrobial agents.

Keywords: *Combretaceae*; Caatinga; antimicrobial; antivirulence

1. Introduction

Each year bacteria, fungi and viruses are responsible for attacking more than two million people causing a number of human illness conditions. A challenge for antimicrobial therapy is the phenomenon of microbial resistance to antibiotics, especially in developing countries where infectious diseases still represent one of major cause of human mortality [1]. According to ANVISA (2009), the genus *Candida* was the most found in hospital infections caused by yeasts [2]. *C. albicans* is an opportunistic fungal pathogen whose ability to become virulent depends on the host immunity. This yeast is considered one of the main causes of a large number of clinical manifestations that include: infections in wounds, pneumonia, endocarditis and septicemia [3]. Several studies have shown that nosocomial infections are a great public health problem worldwide with serious economic consequences, for example in the United States and the United Kingdom around 6.7 billion dollars and 1.06 billion pounds are spent, respectively. In Brazil a rate of 15.5% of hospital infections is found, and no clear data on the economic impact in the country is available. In this context the search for new antimicrobial agents is of utmost importance [4].

Buchenavia tetraphylla (Aubl.) R.A. Howard (Combretaceae: Combretoideae) is a species of neotropical plant, distributed from the Island of Cuba to the state of Rio de Janeiro. In Brazil, this plant is popularly known as "Tanimbuca" and is listed as etnomedicinal plant by traditional communities of northeastern Brazil [5]. Previous study has shown the antimicrobial activity of *B. tetraphylla* against bacteria and fungi. This study evaluated the antimicrobial, anti-biofilm and hyphae inhibition of a methanol extract obtained from *B.*

tetraphylla (BTME) against recent clinical isolates of *C. albicans* [6].

2. Materials and methods

2.1 Plant material: collection, identification and extraction

Samples of *Buchenavia tetrphylla* leaves were collected in November 2013 in Catimbau National Park (Pernambuco, Brazil), processed and identified using traditional taxonomic techniques. The voucher is deposited at the Herbarium IPA, the Agronomic Institute of Pernambuco. Leaves of *B. tetrphylla* were dried at room temperature and then milled using Macsalab 1000 (Model LAB 200). This material was stored in a closed container at dark until be used. The material obtained (25g) was mixed with hexane (100 mL) and subjected to constant stirring in shaker table rotating at 125 rpm for 72 hours at 25 °C. Then the extract was filtered and the supernatant was rotary evaporated, the residue was mixed in 100 mL of each the following solvents in sequential order: chloroform, ethyl acetate and methanol. The residue of each solvent was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and stored (4 °C).

2.2 Phytochemical analysis of *B. tetrphylla* methanolic extract (BTME)

B. tetrphylla methanolic extract was subjected to analysis by thin layer chromatography (TLC) on silica gel plate (Merck) used mobile phases 551 and 532. For the disclosure of the chromatogram following reagents were used: ceric sulfate and chloride ferric. The compounds were identified by comparing their R_fs and the specific revelators for metabolites [7].

2.3 Determination of minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum microbicide (MMC)

MIC and MMC were determined by the microdilution method [8]. Serial dilutions of BTME were made in 96- well plates in Sabouraud broth and 10 µL (about 1.5×10^8 CFU / ml) of yeast suspension was added at each well. The samples were incubated for 24 h at 30 °C. Resazurin solution (0.01%) was used as an indicator for growth. Subsequently, the cultures were plated on Sabouraud agar and incubated for 24 h at 37 °C to determine the CMM.

2.4 Biofilm formation

The biofilm production was carried out using the method described by Shin et al [9] with modifications. Serial dilutions of BTME were in RPMI media and 100 µL of yeast suspension was added. The microplate was incubated at 37 °C. After 24h, the plates were washed twice with distilled water and optical density (OD) was measured on microtiter plate reader at 405 nm. To quantify biofilm production, the percent transmittance (% T) was calculated by subtracting the % T from the values of the negative control (no biofilm production) and interpreted according to the following Negative scale (% T <5), 1+ (5-20% T), 2+ (% T 20-35), 3+ (% T 35-

50), 4+ (% T 50) [9].

2.5 Yeast-hyphal transition assay

The hyphae inhibition assay was performed using the methodology of Yusuf. *C. albicans* strains were grown in RPMI and kept for 48h at 25 °C, to initiate the development of hyphae. To induce the formation of hyphae they were transferred to new media at 37 °C in RPMI pH 6.5. The desired BTME concentrations (MIC /2 and the MIC /4) were added to the media. Every half hour, the pH was adjusted to 6.5 and the cells were observed under the microscope, taking aliquots after every 30 minutes [10].

3. Results and discussion

3.1 Phytochemical Analysis

Phytochemicals results of BTME showed the presence of flavonoids and tannins. Previous research conducted by Oliveira et al. (2012), using a different extraction method, demonstrated the presence of flavonoids, terpenes, proanthocyanidins, leucoanthocianidin, triterpene, carbohydrate and tannin in the hydroalcoholic. Previous studies showed that the presence of these compounds in medicinal plants have antimicrobial activities [11, 12, 13].

3.2 Activity Anti-*C. albicans* of BTME

BTME showed anti- *C. albicans* action against all strains tested with MIC values ranged from 0.078125 mg/mL to 1.25 mg/mL; and CMM of 0.15625 mg/mL to 2.5 mg/mL. The MIC value for the standard strain UFPEDA1007 was 0.625 mg/mL and MMC 2.5 mg/mL. More than 80% of strains were sensitive to BTME at 0.625 mg/mL. A recent work showed a similar anti-*C. albicans* action of extracts and purified compounds of *Buchenavia tomentosa* [14].

3.3 Activity anti-biofilm of BTME

The first step in this assay was the selection of strains with the ability to form biofilm. From the 10 tested strains of *C. albicans*, seven species (F01, F03, F08, F11, F14, F23 and F27) showed high biofilm formation (4+), the standard strain (UFPEDA1007) showed low biofilm production (1+) and isolates F02 and F22 do not produced biofilms. All strains able to produce high amounts of biofilm were exposed to subinhibitory concentrations (MIC/2 and MIC/4). BTME was able to inhibit the biofilm formation of 85.71% strains (6/7). All inhibited strains showed low biofilm formation (+1) when treated with BTME at MIC/2. On the other hand, when exposed to MIC/4, they were classified as +1 (25%; 2/8), +2 (62.5%; 5/8). The biofilm formation of strain F08 was not affected by BTME (Table 1). Study conducted by Diniz et al. showed the presence of flavonoids and tannins in “jabuticabeira” leaf extract which has a significant anti-biofilm activity [15]. One of the main microbial virulence factors is the presence of biofilms making them up to 100 times more resistant to antimicrobial compared with free-living pathogen [16]. Thus, the development of new herbal drugs able to prevent the biofilm formation is extremely important [17].

Table 1 Anti-biofilm from the methanolic extract of *Buchenavia tetraphylla*.

<i>C. albicans</i>	Formati on biofilm	IC/2	IC/4
01	4+	+	+
02	NEGATIVE		
03	4+	+	+
08	4+	+	+
11	4+	+	+
14	4+	+	+
22	NEGATIVE		
23	4+	+	+
27	4+	+	+

Negative (%T < 5), 1+ (%T 5–20), 2+ (%T 20–35), 3+ (%T 35–50), 4+ (%T 50).

3.4 Inhibition of Hyphal Development

As in biofilm assay, the ability of each strain to form hyphae was first determined and only two of studied strains were found with this capacity (F08 and UFPEDA1007). When treated with BTME at MIC/2 for 2 hours an inhibition of 60% was observed. Hyphal development is one of the best known virulence factors used by *C. albicans*, being directly related with the transition of this yeast from a benign member of the mucosal microbiota to a danger pathogen, able to cause infections in susceptible individuals [17].

4. Conclusion

This work showed that the methanol extract obtained from *B. tetraphylla* has a great anti-*C. albicans* action and it is able to inhibit the growth of clinical strains, including those with a high virulence potential. In addition, BTME showed anti-virulence capacity against the most of tested strains as it inhibits biofilm and hyphae formation at subinhibitory concentrations. Therefore, BTME is presented as a promising source of antifungal/antivirulence compounds for the treatment of candidiasis.

Acknowledgments Authors acknowledge the financial support given by the support of Foundation for Science and Technology of the State of Pernambuco – FACEPE, Brazil. The authors are grateful to the laboratories of the

Department of Biochemistry of the Federal University of Pernambuco - UFPE, Brazil.

References

- [1] BRAZIL. World Health Organization. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, ICD, World Health Organization, 2008.
- [2] ANVISA, Indicators trace panorama of resistance in Brazil. 2009.
- [3] YANG, Y.L. 2003. Virulence factors of *Candida* species. *Journal Microbiol. Immunol. Infect.* 36, 223–228.
- [4] CVE. Nosocomial infection indicators for long-term care facilities. São Paulo, 2011.
- [5] WEAVER, P. L. "Buchenavia tetrphylla (Vahl.) Eichler: Granadillo," Tech. Rep. SO-ITF-SM43, Dep. Of Agriculture, Southern Forest Experiment Station, New Orleans, 1991.
- [6] 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 tetrphylla* (Aubl.) R. A. Howard (Combretaceae: Combretoidae. *The Scientific World Journal*. Volume 2012.
- [7] MATOS, F. J. A. Introduction to Experimental Phytochemistry . 3rd Ed . , UFC , Fortaleza, 2009 .
- [8] CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2011). "Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (21st edn) Wayne: M100-S21", Clinical and Laboratory Standards Institute.
- [9] SHIN, J.H.; KEE, S.J.; SHIN, M.G. et al. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J Clin Microbiol* 2002; 40(4):1244–8.
- [10] YOUSUF, S., AHMAD, A., KHAN, A., MANZOOR, N., KHAN, L.A. 2011. Effect of garlic-derivedallyl sulphides on morphogenesis and hydrolytic enzyme secretion in *Candida albicans*. *Med. Mycol.* 49 (4), 444–448.
- [11] MANTHEY, J.A.; GUTHRIE, N.; GROHMANN, K. "Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation". *Current Medicinal Chemistry*, vol. 8, n.2, 2001.
- [12] LIU, H.; MOU, Y.; ZHAO, J. et al. "flavonoids from *Holostachys caspica* and their antimicrobial and antioxidant activities. *Molecules*, v.15, n.11, 2010.
- [13] SUZGEC-SELCUKA, S.; BIRTEKS"OZB, A. S. Flavonoides of *helichrysum chasmolycicum* and its antioxidant and antimicrobial activities. *South African Journal of Botany*, v. 77, 2011.
- [14] TEODORO, G. R., BRIGHENTI, F. L., DELBEM, A. C. B., DELBEM, Á. C. B., KHOURI, S., GONTIJO, A. V. L., KOGA-ITO, C. Y. (2015). Antifungal activity of extracts and isolated compounds from *Buchenavia tomentosa* on *Candida albicans* and non-*albicans*. *Future microbiology*, 10(6),917-927.
- [15] DINIZ, D. N.; MACÊDO-COSTA, M. R.; PEREIRA, M. S. V. et al. Antifungal effect in vitro leaf extract and *Myrciaria cauliflora* berg stem on oral microorganisms. *Rev Odontol UNESP, Araraquara*. maio/jun., 2010; 39(3): 151- 156. © 2010 - ISSN 1807-2577
- [16] YOUSEFBEYK, F.; GOHARI, A. R.; HASHEMIGHADERIJANI, Z. et al. Bioactive terpenoids and flavonoids from *Daucus littoralis* Smith subsp. *Hyrceanicus* rech.f, na endemic species of Iran. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2014.
- [17] 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-

Manuscrito a ser submetido no periódico: Industrial crops and products

3.3 ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E POTENCIAL DE VIRULÊNCIA DE *Buchenavia tetraphylla* CONTRA *Candida albicans*

José Robson Neves Cavalcanti Filho¹, Tiago Fonseca Silva¹, Clovis Macêdo Bezerra Filho¹, Ana Paula Sant'anna da Silva¹, Norma Buarque de Gusmão², Márcia Vanusa da Silva¹, Luís Cláudio Nascimento da Silva³, Maria Tereza dos Santos Correia¹

¹ Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, 50.670-901, Recife, PE, Brasil.

² Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, 50.670-901, Recife, PE, Brasil.

³ Programa de Pós-graduação, Universidade CEUMA, São Luis, MA, Brasil.

* Autor para correspondência. Tel.: * +558121268540; fax: +558121268576.

Email: robsonncavalcanti@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

As infecções relacionadas à assistência à saúde por *Candida* são causas de morbidez e mortalidade, com uma taxa entre 10 e 47% no Brasil e na América Latina. Nas últimas décadas a resistência antifúngica aumentou e o número de medicamentos encontrados no mercado (MOTTA, F. A. et al.; 2017). O gênero *Candida* engloba micro-organismos presentes na microbiota normal do ser humano. Alguns fatores individuais contribuem para as infecções por essa levedura, que são: o rompimento das barreiras cutânea e mucosa, disfunção dos neutrófilos, defeito na imunidade mediada por células, desordem metabólica, exposição direta aos fungos, extremos de idade (recém-nascidos e idosos), desnutrição aguda, longo tratamento com antibióticos, quimioterapia, transplantes, resistência a antifúngicos (BARBEDO, L.S; SGARBI, D.B.G., 2010; HARTMANN, A. et al.; 2016).

A patogenicidade desses micro-organismos é estabelecida pela sua capacidade de determinar doença, mediada por vários fatores, como: aderência, formação de biofilme, produção de exoenzimas (proteinase e fosfolipase), produção de tubo germinativo, variações genotípica e fenotípica (HARTMANN, A. et al.; 2016). Portanto, vem se buscando novas alternativas terapêuticas, como a descoberta dos compostos bioativos com potencial promissor (TEODORO, G. R. et al.; 2015; CAVALCANTI-FILHO et al., 2017).

Algumas plantas da Caatinga (bioma exclusivo do Brasil) no Nordeste brasileiro, são utilizadas pela população devido suas propriedades medicinais, que atuam no tratamento de doenças por fungos e bactérias (ARAÚJO et al., 2017). A *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) R. A. Howard (Combretaceae: Combretoideae), uma espécie neotropical que encontra-se na Caatinga e é popularmente conhecida como “tanimbuca”. Embora relativamente pouco estudada, esta espécie está relacionada como uma planta etnomedicinal utilizada 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.

Cavalcanti Filho et al. (2017), analisaram em pesquisas o potencial citotóxico e antimicrobiano do extrato metanólico da *B. tetraphylla*, apresentando resultados anti-*C. albicans*, além de demonstrar efeitos aditivos e sinérgicos quando combinado com o fluconazol. Nas células tratadas com esse extrato foram observadas modificações estruturais externas, com rachaduras e encolhimento celular que pode ser atribuído a perda do volume citosólico. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi determinar o efeito de uma fração obtida do extrato *B. tetraphylla* sobre o crescimento e fatores de virulência de isolados clínicos de *C. albicans*. A caracterização química da fração também foi realizada e em modelos *in vivo* de *T. molitor*.

2. MATERIAS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS da planta: coleta, identificação e EXTRAÇÃO.

As folhas de *B. tetraphylla* foram coletadas no Parque Nacional do Catimbau (PARNA do Catimbau, Pernambuco, Brasil) em novembro de 2013. A identificação foi realizada pelo Dr. Alexandre Gomes da Silva e depositada no herbário IPA (Instituto Agrônômico de Pernambuco), com voucher de número 84.104. As folhas foram secas utilizando uma incubadora a 45°C por 2 a 3 dias. O material foi moído em forma de pó usando um moedor seguindo de um liquidificador *waring*.

O material obtido (25 g) 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 submetida à evaporação rotativa, o resíduo foi misturado em 100 mL de cada um dos solventes em ordem sequencial: clorofórmio, acetato de etila e metanol. O extrato de cada solvente foi dissolvido em Dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenado (4 °C).

2.2 SEMI-PURIFICAÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO DE *b. TETRAPHYLLA*

O extrato metanólico foi de escolha pra realização da comatografia, porque apresentou o melhor resultado anti-*Candida*. Foram utilizados 2 g desse extrato em cromatografia de coluna aberta Sephadex LH-20 com fase estacionária, utilizando-se MeOH e MeOH: CHCl₃ (1:1) como eluentes.

2.3 ANÁLISES DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

As frações obtidas da coluna cromatografica foram submetidas a análises por cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de sílica gel Merck F. Para a revelação do cromograma foram utilizados os seguintes reagentes: sulfato cérico e

cloreto férrico. As frações foram identificados com mesmos perfis Rfs e visualização em luz ultravioleta sendo reunidas as semelhantes.

2.4 ANÁLISES lc-ms/Q-TOF

A fração I do extrato metanólico foi submetida a uma análise não segmentada por LC-MS / Q-TOF. A cromatografia foi realizada em um sistema Dionex UltiMate® 3000 Quaternary Rapid Separation UHPLC + (Thermo Fisher Scientific, Germering, Alemanha). A separação foi alcançada em uma coluna Kinetex 1.7u XB-C18 (100 x 2.1 mm, 1.7 μ m, 100 Å, Phenomenex, Torrance, CA, EUA). Foi utilizado ácido fórmico (0,05%) em água e acetonitrilo (fornecido com ácido fórmico a 0,05%) como fases móveis A e B, respectivamente. Condições de gradiente: 0.0-1.0 min, 5% B; 1,0-12,0 min, 5-40% B; 12,0-20,0 min 40-100% B, 20,0-22,0 min 100% B, 22,0-22,5 min 100-5% B e 22,5-25,0 5% B. A taxa de fluxo da fase móvel foi de 300 μ L min⁻¹. A temperatura da coluna foi mantida a 30 ° C. Quatro comprimentos de onda (205 nm, 220 nm, 250 nm e 390 nm) foram monitorados por um detector UV-VIS.

A cromatografia líquida foi acoplada a um espectrômetro de massa micrOTOF-Q (Bruker, Bremen, Alemanha) equipado com uma fonte de íons eletrospray (ESI) operada em modo de ionização positiva ou negativa. A tensão de pulverização iônica foi mantida a +4500 V ou -3900 V, respectivamente. A temperatura seca foi ajustada para 200 °C e o fluxo de gás seco foi ajustado para 8 L min/1. O gás de nebulização foi ajustado para 2,5 bar e energia de colisão para 15 eV. O nitrogênio foi usado como gás seco, gás nebulizador e gás de colisão. O intervalo m/z foi ajustado para 50-1400. O modo AutoMSMS foi utilizado para obter os espectros MS e MS/MS dos três íons mais abundantes presentes em cada ponto do tempo com exclusão inteligente para incluir também íons menos abundantes. Todos os arquivos foram calibrados com base em espectros compostos coletados de clusters formados em Na⁺ no início de cada corrida.

2.5 OBTENÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS

Nesse estudo foram utilizados no total 10 linhagens de *C. albicans*, apresentando um linhagem padrão (UFPEDA1007) pertencentes à coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA) e 9 espécies clínicas isoladas de secreção vaginal obtidas através de solicitações a diversos Laboratórios de Análises Clínicas de Recife (Pernambuco, Brasil).

2.6 TESE DE DIFUSÃO EM MEIO SÓLIDO

Após a cromatografia de coluna aberta Sephadex LH-20 apresentou 10 frações, onde foram utilizadas estas frações para realização do teste em disco seguindo a recomendação da CLSI (CLSI, 2011). As linhagens 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 contendo frações do extrato metanólico de *B. tetraphylla* (A a J). As placas foram incubadas a 30 °C por 24 horas, após a incubação, os halos de inibição foram analisados para a escolha da melhor fração.

2.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI) E CONCENTRAÇÃO MÍNIMA FUNGICIDA (CMF)

A CMI e CMF foram realizados através da metodologia descrita por Cavalcanti Filho et al. (2017). A CIM foi determinada pelo método de microdiluição (CLSI, 2011). A diluição em série da fração I foi preparado em caldo Sabouraud, 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. A CIM foi determinado na menor 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 CMF que corresponde à concentração mínima da fração I que eliminaram as Leveduras.

2.8 ENSAIO DE INIBIÇÃO DE HIFAS

No ensaio de inibição de hifas foi utilizada a metodologia de Yusuf et al. (2011). *C. albicans* foram cultivadas em meio RPMI e mantidas durante 48 h a 25°C, para iniciar o desenvolvimento de hifas. Para induzir a formação de hifas, foram transferidas para novos meios de RPMI a 37°C no pH 6,5. As concentrações desejadas da fração I do extrato metanólico da *B. tetraphylla* (MIC/2 e MIC/4) foram adicionados ao meio. A cada meia hora, o pH do meio foi ajustado para 6,5 e as células foram observadas ao microscópio, tomando alíquotas após cada 30 minutos (Yusuf et al.,2011).

2.9 FORMAÇÃO DE BIOFILME

A produção de biofilme foi avaliada usando o método descrito por Shin et al. (2002) com modificações. Foram utilizadas microplacas de poliestireno com 96 poços, preparadas com inóculo (100 mL; 0,5% escala de McFaland) em 100 mL de meio RPMI. A microplaca foi incubada durante 24h a 37°C, sob agitação contínua a 50 rpm, lavadas duas vezes com água destilada e densidade óptica foi medida no leitor de microplacas a 405 nm. Para quantificar a produção de biofilme, a percentagem de transmitância (%T) foi calculado subtraindo a% de T a partir dos valores do controle negativo (sem produção de biofilme).

2.10 AVALIAÇÃO DA HIDROFOBICIDADE DA SUPERFÍCIE CELULAR (HSC)

A hidrofobicidade dos isolados de *C. albicans* foi avaliada pelo Ensaio de Adesão Microbiana a Solvente proposto por Bellon-Fontaine e Rault, que consiste na afinidade fúngica a um solvente apolar (hexano). Em seguida, as células fúngicas foram suspensas em tampão fosfato de potássio (0,01 M; pH 6,5) e foi realizada uma leitura a absorvância a 600 nm (Abs1) de 0,4 (~ 10⁸ UFC mL⁻¹). Esta suspensão foi misturada ao solvente (1:6 v/v) por agitação durante 90 segundos até formar uma emulsão. Após repouso em temperatura ambiente por 20 minutos (com separação de duas fases) a

absorbância da fase aquosa foi mensurada (Abs2). A porcentagem de adesão microbiana ao solvente hidrofóbico (HSC) foi expressa seguindo a fórmula:

$$\text{HSC (\%)} = (1 - \text{Abs2/Abs1}) \times 100.$$

A classificação para cada linhagem foi realizada segundo os critérios de Ishida K et al. (2013), em HSC baixa para valores <30% e valores considerados altos para HSC >70%.

2.11 ENSAIO DE PROTEINASE

O ensaio de proteinase foi realizado como descrito por Yousuf et al. (2011). As espécies foram expostas a diferentes concentrações da fração I por 5 minutos e foram colocadas em placa de Petri contendo meio Agar proteinase, incubar a 37° C por 4 dias. As placas foram analisadas medindo o halo de produção de secreção de proteinase ao redor das colônias.

2.12 ENSAIOS ANTIMICROBIANO COM *TENEBRIO MOLITOR* (TENEBRIONIDAE)

2.12.1 Seleção de composto anti-infectivos

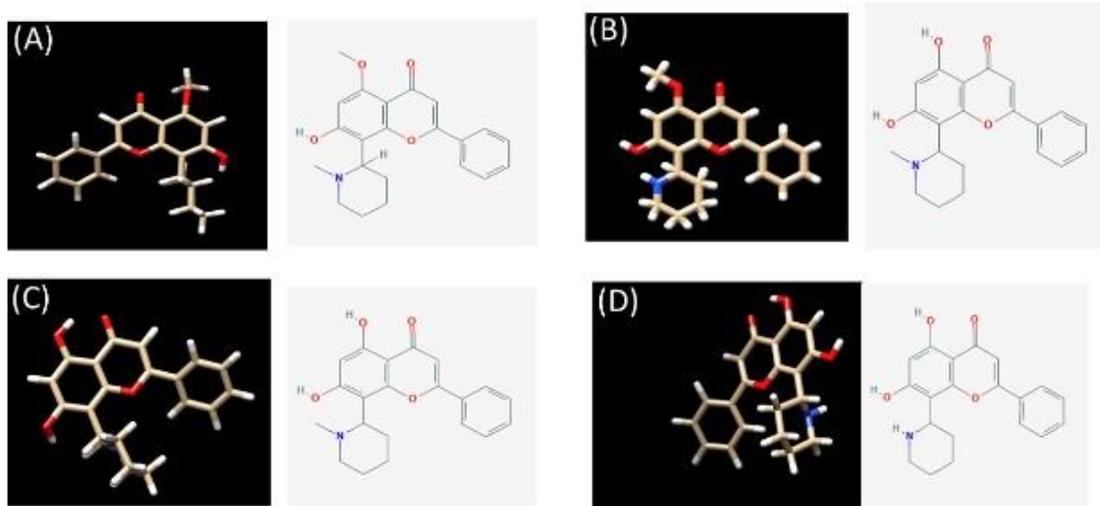
Larvas de *T. molitor* com aproximadamente 100 mg foram randomizadas em grupos de no mínimo 15 indivíduos. O *T. molitor* antes da inoculação, os corpos foram limpas com álcool 70% e injetados com uma Seringa de Hamilton 10 µL da suspensão microbiana ($1,0 \times 10^5$ UFC/mL) na última pata falsa das larvas (do inglês proleg). As larvas foram incubadas a 37°C. Após 2 horas, grupos de larvas receberam 10 µL da fração em diferentes concentrações (125 µg/mL, 250 µg/mL ou 500 µg/mL). A viabilidade foi avaliada diariamente pela ausência de movimento. Larvas inoculadas com o micro-organismo e tratadas com PBS serão utilizadas com controle positivo, enquanto larvas não infectadas o controle negativo. A morte de todas as larvas do grupo experimental ou a transição para forma de pupa determinou o término do experimento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Detecção de buchenavianina e seus derivados na fração I do extrato metanólico de *B. tetraphylla*

A caracterização química do extrato metanólico das folhas de *B. tetraphylla* revelou a presença de buchenavianina e seus análogos (Figura 1). A buchenavianina e derivados [O-desmetilbuchenavianina, N-O-desmetilbuchenavianina] são classificados como flavoalcalóides com uma porção de piperidina no carbono 8.

Figura - 1 Estruturas de buchenavianina e seus derivados. (A) Buchenavianina; (B) N-desmetilbuchenavianina (C) O-desmetilbuchenavianina (D) N-O-desmetilbuchenavianina



Fonte: O Autor .

Além da presença desses compostos, a fração analisada apresentou outros 6 compostos, que são: Kaempferol, epicatequina, quercetina, kaempferol-3-O-glucoside, quercetina-3-O-hexosídeo e procianidina B2.

Em estudo realizado por Teodoro et al. (2011), foi encontrado o composto buchenavianina e derivados no extrato aquoso da *Buchenavia tomentosa*. Ferreira (2016), identificou em folhas e frutos de *Buchenavia macrophylla* Eichler os flavonóides alcalóides Buchenavianina e N-Dimetilbuchenavianina. Além disso, mostrou que os extratos aquosos testados apresentaram um melhor poder antifúngico, o

que corrobora com o presente estudo, onde o fracionamento do extrato metanólico de *B. tetraphylla* evidenciou a presença do mesmo composto buchenavianina encontrado nesta pesquisa.

3.2 Ação anti-*Candida* das frações do extrato metanólico *B. tetraphylla*

Após o fracionamento do extrato metanólico de *B. tetraphylla*, foram obtidas 10 frações (A a J). Foram realizadas atividade antimicrobiana pelo ensaio de teste em disco para fazer um *screening* da melhor fração para realização de testes posteriores. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 2. A fração I apresentou o melhor resultado quando testado contra a linhagem padrão UFPEDA1007 e o isolado clínico F01 de *C. albicans*, obtendo halos com os respectivos valores a seguir 9.07 mm e 12.31 mm. Outras frações apresentaram resultados positivos como a fração B e D, assim sendo testadas contra outras linhagens de *C. albicans*, como podem ser visto na tabela 3.

Tabela 1: Análise anti-*Candida* das frações pelo ensaio de teste de difusão em meio sólido

Frações	UFPEDA1007	F01
A	N/A	N/A
B	8.13 mm	10.73 mm
C	N/A	8.72 mm
D	9.21 mm	7.82 mm
E	N/A	N/A
F	N/A	N/A
G	N/A	N/A
H	N/A	N/A
I	9.07 mm	12.31 mm
J	N/A	N/A

N/A- Não apresentou atividade/resultados dos halos estão apresentados em mm.

Tabela 2: Análise anti-*Candida* das frações B, D, I, pelo ensaio de teste em disco contra espécies clínicas isoladas de secreção vaginal.

F									
ração	01	02	03	08	11	14	22	23	27
B	.19	.77	6.05	.61	2.79	.16	0.19	1.38	.79
D	.69	.28	2.36	0.37	.27	.67	.07	2.33	/A
I	.11	.27	5.38	0.87	2.72	0.82	.99	1.60	2.34

N/A- Não teve atividade /resultados dos halos estão apresentados em mm.

3.3 Atividade anti-*C.albicans* da fração I de *B. tetraphylla*

A ação inibitória da fração I do extrato metanólico de *B. tetraphylla* foi analisada contra 10 linhagens de *C. albicans* (tabela 4). A fração I apresentou ação anti-*C. albicans* para todas as linhagens, apresentando o valor de CMI para a linhagem UFPEDA1007 de 7,8125 µg/mL e para as linhagens de isolados clínicos (F01, F02, F03, F08, F11, F14, F22, F23 e F27) valores entre 3,90625 e 31,25 µg /mL. Para o CMF da linhagem padrão e isolados clínicos foram obtidos os valores entre 15,625 e 250 µg /mL. Em trabalho realizado por Teodoro et al. (2015), demonstrou que as CMIs encontradas variaram entre 200 e 25000 µg /mL para todas as espécies de *Candida*. A eficiência antifúngica da fração I (buchenavianina e seus derivados) encontrada neste trabalho aumentam sua relevância.

Batista et al. (2010), comprovaram ação antifúngica contra as leveduras de espécies de *Candida*, a partir de extrato do fruto contendo o composto buchenavianina de *B. tomentosa*. Os extratos de *Buchenavia tomentosa* estudados no *screening*

apresentaram atividade antifúngica para todas as cepas padrão de *Candida* spp. (TEODORO et al., 2015).

Estudos realizado por Cavalcanti Filho et al. (2017), relataram ação anti- *C. albicans* nos extratos metanólico, clorofórmico, hexânico e acetato de etila. Mostrando que os resultados obtidos corroboram com presente estudo. Pesquisa realizadas por Oliveira et al. (2012), com o extrato hidroalcolico/frações de *B. tetraphylla* contra a *C. albicans* (UFPEDA1007), foram constatados 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.

Tabela 3: Atividade anti-*C. albicans* da fração I do extrato metanólico da *B. tetraphylla*

Leveduras	CMI	CMF
UFPEDA1007	7,8125	15,625
F01	15,625	250
F02	31,25	250
F03	31,25	62,5
F08	15,625	31,25
F11	15,625	125
F14	15,625	62,5
F22	3,90625	62,5
F23	7,8125	15,625
F27	31,25	62,5

Resultados apresentados em µg/ml

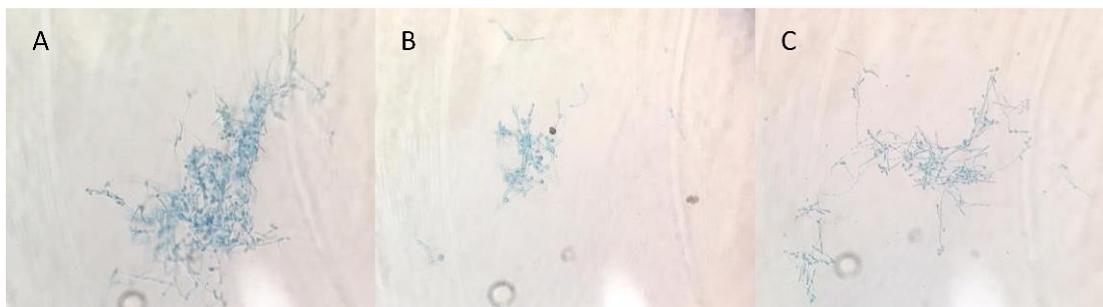
Do mesmo modo, Katerere et al. (2012) analisaram plantas da família Combretaceae, que possuíam flavonoides e todas apresentaram atividade antifúngicas. Flavonóides, taninos e outros metabólitos secundários têm recebido atenção nos últimos anos devido às suas propriedades farmacológicas diversa, incluindo efeitos citotóxicos,

antioxidantes, quimioprolifáticos, suas atividades antifúngicas, antioxidantes, anti-inflamatórias (MOHAMMAD, F.; 2016; AIRES, 2017).

3.4 Inibição do desenvolvimento de hifas

O teste de inibição de hifas foi realizado com duas linhagens de *C. albicans* (UFPEDA1007 e F27), as duas espécies apresentaram capacidade de produzir pseudo-hifas, sabemos que esta produção se dá pela capacidade de patogenicidade desse micro-organismo. Nesta pesquisa podemos apresentar uma possível inibição de hifas, onde mostra que em concentrações sub-inibitorias pode haver a diminuição da formação de hifas. Morais – Braga et al. (2017), observaram que houve redução de hifas e pseudo-hifas da *Candida* spp quando tratado com extratos ricos em taninos e flavonoides.

Figura 2: Inibição de hifas da linhagem de *Candida albicans* (F27) tratada com fração I do extrato metanólico da *B. tetraphylla*.



Controle (A); CMI/2 (B); CMI/4 (C).

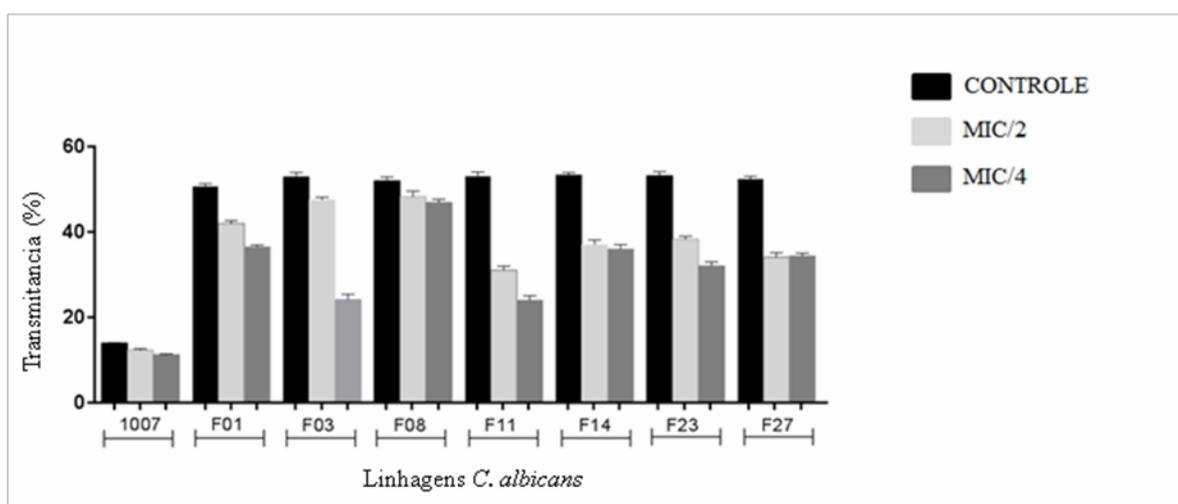
Estudo realizado por Cavalcanti Filho (2014), mostraram uma possível inibição de pseudo-hifas da *Candida albicans* quando tratada com o extrato metanólico da *B. tetraphylla* rico em taninos e flavonoides. Estes estudo mostraram que possivelmente este micro-organismo perdeu sua patogenicidade. Yamaguchi et al. (2011), observaram que células tratadas com compostos ricos em taninos apresentavam inibição de hifas na levedura. Estes resultados apresentam simetria com os observados nesta pesquisa,

obtendo modificações estruturais na morfologia celular. Flavonoides e taninos presentes em extratos de Própolis apresentaram resultados significativos para a inibição dos fatores de virulências, tais como, formação de pseudo-hifas, fosfolipase celular e tubo germinativo no tratamento de *Candida albicans* (D'AURIA et al., 2007). Assim, pesquisas com compostos bioativos têm alcançado resultados promissores em atividades terapêuticas como, por exemplo, antifúngica e bactericida; antioxidantes e protetora dos raios ultravioleta (VIOLANTE et al., 2009).

3.5 Atividade anti-biofilme da fração I

Neste ensaio, foram testadas 10 linhagens de *C. albicans* e 7 espécies delas (F01, F03, F08, F11, F14, F23 e F27) apresentaram formação de biofilmes com absorbância de maior que 50%. A linhagem padrão (UFPEDA1007) apresentou 14, 02%; e F02 e F22 não produziram biofilmes. Os micro-organismos que apresentaram resultados positivos foram expostos a fração I nas concentrações de MIC/2 e MIC/4. Na concentração do CIM/2, as linhagens que apresentaram formação de biofilme maior ou igual a 50%, quando tratadas com CIM/2 houve uma redução de aproximadamente 25% (figura 4). As linhagens que tiveram resultados entre 5 a 20% na formação de biofilme, foram mantidas quando submetidas ao tratamento nas duas concentrações.

Figura 3: Atividade anti-biofilme da fração I de *C. albicans*



Santana (2012), em experimentos realizados com *C. albicans*, todas as espécies testadas foram capazes de formar biofilmes. Sendo esse ensaio um dos mais importantes fatores de virulência. Extratos ricos em flavonoides e taninos encontrados de folha de *B. tetraphylla*, apresentaram resultados satisfatório na atividade anti-biofilmes quando tratados com esse extrato (CAVALCANTI –FILHO et al., 2016). A fração I foi capaz de inibir a formação de biofilme de *C. albicans* em concentrações de MI/2 e MIC/4. Resultados similares foram observados por Capoci et al. (2015) e Teodoro et al. (2016) que realizaram estudos com plantas da mesma família.

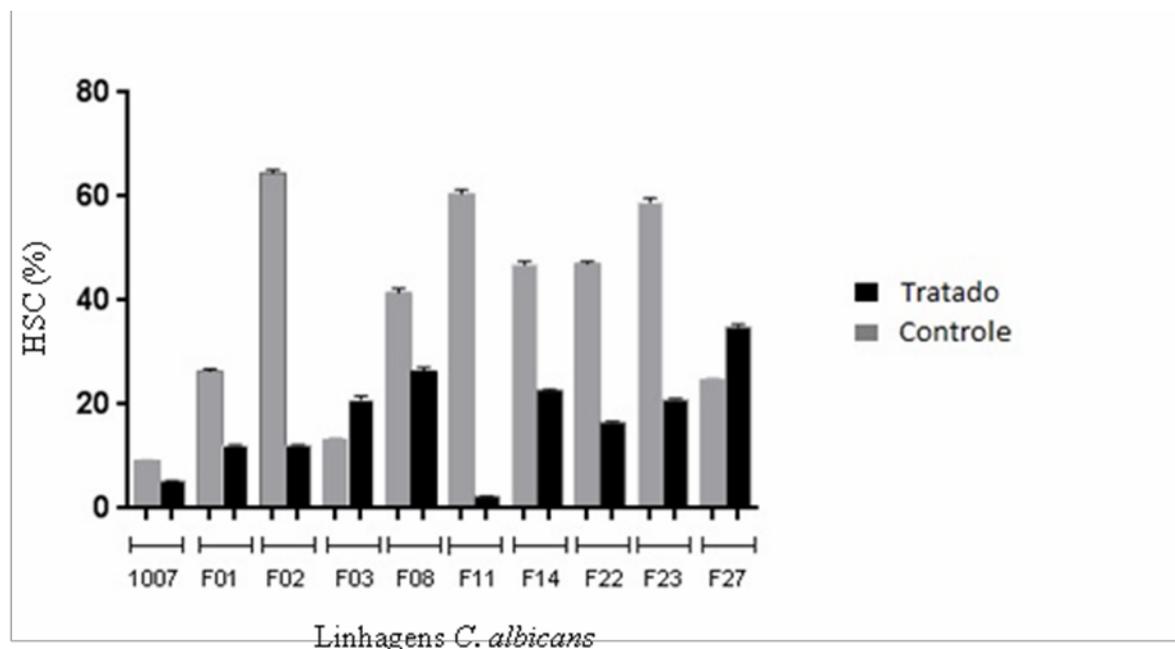
Peralta et al. (2015), em ensaio anti-biofilme realizado com flavonoides 8PP contra *C. albicans*, observaram que quando as células foram tratadas com este composto apresentaram resultados positivos, corroborando com este trabalho. Os metabolitos secundários presentes em plantas influenciam atividades antifúngicas, além de apresentar resultados significativos na inibição dos fatores de virulência, tais como a inibição de biofilmes (BONVEHI et al., 2012; ALMEIDA et al., 2012).

3.6 Hidrofobicidade de superfície celular

Das 10 linhagens de *C. albicans* estudadas, 8 apresentaram no controle hidrofobicidade de superfície celular com valores médio e duas apresentaram com HSC baixo. Quando submetidos ao tratamento com a fração I, 9 linhagens obtiveram redução do resultados e apenas uma (F27) mostrou um aumento, como mostra na figura 5. Rodrigues et al. (2009), obseram que após a incubação a 36° C de 16 amostras apresentaram resultados altamente hidrofóbica. Componentes da superfície celular promovem (hidrofobinas) ou reduzem (hidrofilinas) as propriedades que podem coexistir na superfície micro-organismos, podendo ocorrer alterações na estrutura da matriz de exopolissacarídeos durante a curva de crescimento (CHIA, T. W. et al., 2008; ROSENBERG, M. & KJELLEBERG, S.; 1986).

A presença de amostras com alta e de média hidrofóbicas apresentaram a capacidade de formação de biofilme, nos fazem supor que, quanto maior o tempo de contato com a superfície, maior a chance de aderência destes micro-organismos (RODRIGUES et al., 2009).

Figura 4: Hidrofobicidade de Superfície Celular de células tratadas com a fração I do extrato metanólico de *B. tetraphylla*.

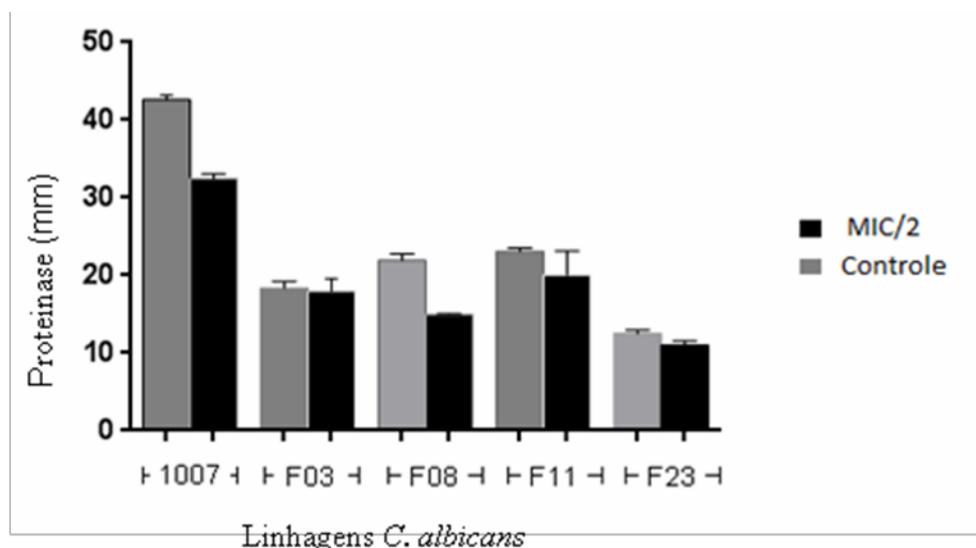


HSC baixa para valores <30% e valores considerados altos para HSC >70%.

3.7 Proteinase

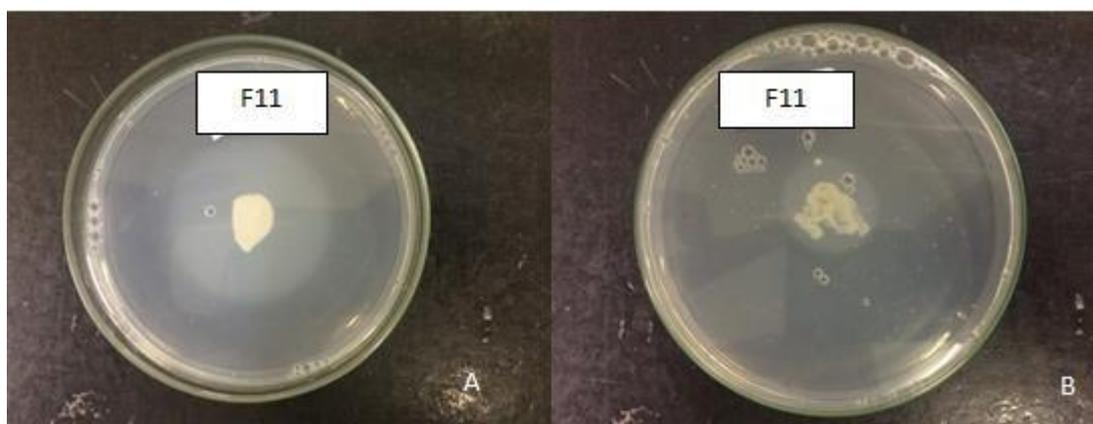
No teste de produção de proteinase, foram submetidos 5 espécies ao tratamento com a fração I na concentração subinibitória (MIC/2), onde os resultados foram satisfatórios (Figura 6). Mostrando que o tratamento com essa fração conseguiu diminuir a produção de proteinase que é um grande fator da virulência desse micro-organismo. Todas as espécies de *C. albicans* testadas tiveram um resultado na redução do halo entre 2 a 10 mm (Figura 7).

Fosfolipases são enzimas consideradas importantes fatores de virulência de *C. albicans*, sua diminuição e ausência desta enzima pode mostrar redução da patogenicidade para algumas espécies de *Candida* spp. (MOHAN, V. & BALLAL, M., 2008).

Figura 5: Produção e Inibição da Proteinase

Em estudo realizado por Mattei et al. (2013). 78 e 97% dos isolados apresentaram atividades de fosfolipase e proteinase, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com o apresentado nesta pesquisa. As proteinases secretadas pelas espécies de *C. albicans* são capazes de degradar matriz extracelular e os componentes basais da membrana, podendo causar a destruição de células hospedeiras (JARVENSIVU et al., 2004; ANIBAL, 2007).

Teodoro et al. (2016), avaliou a produção dessa exoenzima, todas tiveram produção positiva para fosfolipase. Quando submetida ao tratamento com extrato de *B. tementosa*, não obteve redução. Mostrando que esses compostos utilizados diferem dos resultados encontrados nesta pesquisa.

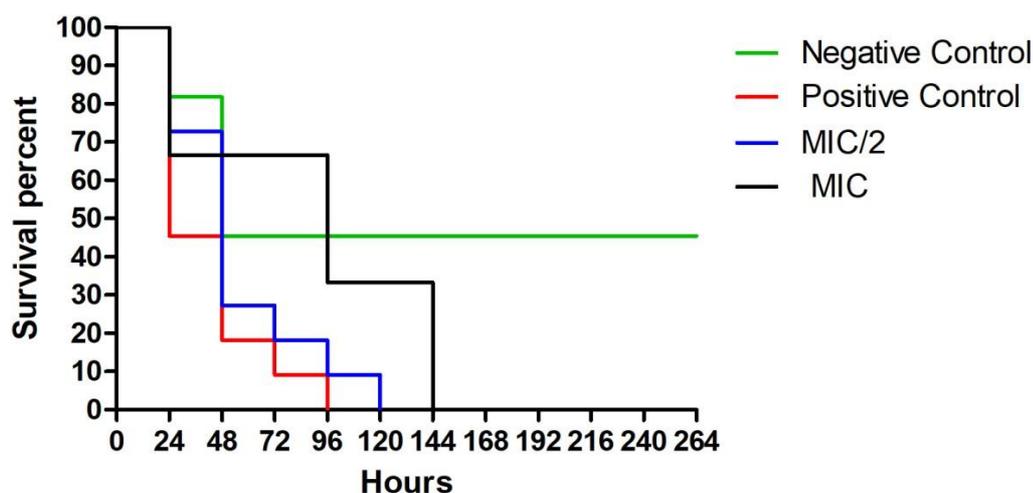
Figura 6: halo produção de proteinase

A- Controle/B-tratada com a fração I

3.8 Ensaio antimicrobiano com *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae)

Das 10 linhagens de *C. albicans* estudadas, foi utilizada uma para realização do ensaio antimicrobiano *in vivo* e estes insetos foram avaliados durante 264 horas (11 dias). Os insetos infectados pela linhagem UFPEDA1007, quando tratados com a o MIC e MIC/2 tiveram sobrevida de 24 e 48 horas, respectivamente, quando comparado com o grupo controle positivo. As larvas de *Tenebrio molitor* quando contaminadas e tratadas com compostos isolados da *Piper* spp. promoveram mortalidade acima de 80% (FAZOLIN et al; 2007), quando comparado com os insetos contaminados por *C. albicans* e tratados com a fração I de *B. tetraphylla* teve a sobrevida de 48 horas. Estudos realizados por Osimani et al. (2017), inocularam no *Tenebrio molitor* cepas resistentes a antibióticos, quando tratado pelo mix de antibióticos, como: tetraciclina, macrolídeos-licosamida-estreptogramina, vancomicina, beta-lactâmicos e aminoglicosídeos. Estes insetos responderam ao ensaio, diminuindo a mortalidade, quando comparado com o controle infectado a micro-organismos resistentes a antibióticos. Assim, estes resultados corroboram com os obtidos nesta pesquisa.

Figura 7: Ensaio antimicrobiano *in vivo* com *Tenebrio molitor*



4. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi identificada a fração I, que demonstrou a presença de buchenavianina e seus derivados, induziu as mudanças morfológicas, reduzindo a produção e expressão de fatores virulência no tratamento das espécies de *C. albicans*. Além, de demonstrar que a *B. tetraphylla* é uma ótima fonte de compostos contra atividade anti-*Candida*. Assim, o uso de *B. tetraphylla* e seus compostos isolados apresentam novas alternativas e estratégias para o controle de IRAS com a utilização de produtos naturais extraídos da caatinga.

5. REFERÊNCIAS

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

AIRES, A.; DIAS, C.; CARVALHO, R.; SAAVEDRA, M. J. ANALYSIS OF GLYCOSYLATEDFLAVONOIDS EXTRACTED FROM SWEET-CHERRY STEMS, AS ANTIBACTERIAL AGENTS AGAINST PATHOGENIC ESCHERICHIA COLI ISOLATES. **ACTA BIOCHIMICA POLONICA**, 2017.

ALMEIDA, L. F. D. CAVALCANTI, Y. W.; LIRA-JUNIOR, R.; LIMA, E. O.; CASTRO, R. D. EFEITO ANTIFÚNGICO DE TINTURAS DE PRÓPOLIS E ROMÃ SOBRE ESPÉCIES DE CANDID. **REV. CUBANA DE ESTOMATOL.** 2012; 26 (2): 99-106.

ANIBAL, P. C. **POTENCIAL DE AÇÃO ANTIMICROBIANA IN VITRO DE EXTRATOS DE PLANTAS NA INIBIÇÃO DE CANDIDA SPP, STREPTOCOCCUS MUTANS E STAPHYLOCOCCUS AUREUS.** DISSERTAÇÃO APRESENTADA DISSERTAÇÃO APRESENTADA À FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA, DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS PIRACICABA, SP : [S.N.], 2007.

BARBEDO, L.S.; SGARBI, D.B.G. Traditional medicinal plants from underexploited environments, such as the caatinga, na exclusively brazilian biome, have been the subject of various studies in the search for new antimicrobial compound. **Candidíase. J Bras Doenças Sexualm Transm.** 2010.

BATISTA, A.L.; VIOLANTE, I.M.P.; GARCEZ, W.S.; GARCEZ, F.R. Compostos Fenólicos isolados de *Buchenavia tomentosa* Combretaceae. In: **33a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – Sociedade Brasileira de Química**; 28-31 mai 2010. Águas de Lindóia. QPN-256.

BELLON-FONTAINE, M.; RAULT, J.; VANOSS, C. MICROBIAL ADHESION TO SOLVENTS: A NOVEL METHOD TO DETERMINE THE ELECTRON-DONOR/ELECTRON ACCEPTOR OR LEWIS ACID-BASE PROPERTIES OF MICROBIAL CELLS. **COLLOIDS SURF B BIOINTERFACES**. 1996.

CAPOCI, I.R.; BONFIM-MENDONCA, P.D.E.S.; ARITA, G.S.; PEREIRA, R.R.; CONSOLARO, M.E.; BRUSCHI, M.L. ET AL. PROPOLIS IS AN EFFICIENT FUNGICIDE AND INHIBITOR OF BIOFILM PRODUCTION BY VAGINAL CANDIDA ALBICANS. **EVID BASED COMPLEMENT ALTERNAT MED**. 2015;2015:287693. DOI: 10.1155/2015/287693.

CAVALCANTI FILHO, J. R. N. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de óleos essenciais extraídos de *Buchenavia tetraphylla***. Dissertação de mestrado do programa de Pós-graduação em ciências biológicas, UFPE. 2014.

CAVALCANTI FILHO, J. R. N. et al. **Biological activities of methanolic extract of *Buchenavia tetraphylla***. *Microbes in the spotlight: recent progress in the understanding of beneficial and harmful microorganisms*. BrownWalker Press. 2016

CAVALCANTI FILHO, J. R. N.; SILVA, T. F.; NOBRE, W. Q.; OLIVEIRA DE SOUZA; L. I., SILVA E SILVA FIGUEIREDO, C. S.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. D.; GUSMÃO, N. B.; SILVA, M.V.; DA SILVA, L.C.N.; CORREIA, M. T. D. S. Antimicrobial activity of *Buchenavia tetraphylla* against *Candida albicans* strains isolated from vaginal secretions. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1521-1527, 2017.

CHIA, T.W.; FEGAN N.; MCMEEKIN T.A. & DYKES G.A. Salmonella Sofia differs from other poultry-associated Salmonella serovars with respect to cell surface hydrophobicity. **Journal of Food Protection**. 71: 2421-2428. 2008.

CLINICAL ND LABORATORY STANDARS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing (21 st edn) Wayne: M100-S21. 2011.

D'AURIA, F. D. et al. Effect of própolis on virulence factors of *Candida albicans*. **J Chemother.** 2003;15 (5):454-460.

FAZOLIN, M. et al. PROPRIEDADE INSETICIDA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE Piper hispidinervum C. DC.; Piper aduncum L. e Tanaecium nocturnum (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum SOBRE Tenebrio molitor L., 1758. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 113-120, jan./fev., 2007.

FERREIRA, M. D. S. **Toxicidade sistêmica e reprodutiva do fruto de Buchenavia sp. em roedores.** Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016.

HARTMANN, A. et al. Incidência de *Candida* spp. na mucosa oral de pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) no município de Santo Ângelo -RS. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, Santa Cruz do Sul, v. 6, n. 3, jul. 2016.

ISHIDA K et al. Characterization of *Candida* spp. Isolated from vaginal fluid: identification, antifungal susceptibility, and virulence profile. *Acta Scientiarum. Health sciences.* Maringá 2013.

JÄRVENSIVU A, HIETANEN J, RAUTEMAA R, SORSA T, RICHARDSON M. *Candida* yeasts in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo. **Oral Dis.** 2004; 10: 106-112.

MATTEI, A. S. et al. Determination of germ tube, phospholipase, and proteinase production by bloodstream isolates of *Candida albicans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** 46(3):340-342, 2013.

MOHAN, V.; BALLAL, M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. **Rev Iberoam micol.** 2008; 25:208-210.

MOHAMMAD, F.; HASAN, W. A.; MOHAMED, E. G. Natural antioxidant flavonoids in formalin-induced mice paw inflammation; inhibition of mitochondrial sorbitol dehydrogenase activity. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, 2017.

MORAIS-BRAGA, M. F. B. et al. **COMPOSIÇÃO QUÍMICA, EFEITO INIBIDOR E ANTIPLEOMÓRFICO DA INFUSÃO DAS FOLHAS DE *Psidium guajava* L. SOBRE *Candida* spp.** VI Simpósio de Plantas Mediciniais do Vale do São Francisco. 2017.

MOTTA, F.A.; DALLA-COSTA, L.M.; MURO, M.D., Cardoso MN, Picharski GL, Jaeger G, et al. Risk factors for candidemia mortality in hospitalized children. **J Pediatr (Rio J)**. 2017;93:165---71.

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**. 2012.

OSIMANI, A. et al. Occurrence of transferable antibiotic resistances in commercialized ready-to-eat mealworms (*Tenebrio molitor* L.). **International journal of food microbiology**. (2017) 263: 38-46.

PERALTE, M. A. et al. Antifungal activity of a prenylated flavonoid from *Dalea elegans* against *Candida albicans* biofilms. **Phytomedicine**. 2015.

RODRIGUES, L. B. et al. Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella* heidelberg isoladas de abatedouro avícola. **Acta Scientiae Veterinariae**. 37(3): 225-230, 2009.

ROSENBERG M. & KJELLEBERG S. Hydrophobic interactions in bacterial adhesion. **Advances in Microbial Ecology**. 9: 353-393. 1986.

SANTANA, D. P. **AÇÃO DE CHALCONAS SOBRE A FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Candida albicans* ISOLADAS DE CAVIDADE BUCAL.**

Dissertação de mestrado do programa de Pós-graduação em ciências moleculares, UEGO. 2012.

SHIN, J.H.; KEE, S.J.; SHIN, M.G. et al. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from non neutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. **J Clin Microbiol** 2002; 40(4):1244–8.

TEODORO, G. R. et al. Antifungal activity of extracts and isolated compounds from *Buchenavia tomentosa* on *Candida albicans* and non-albicans. **Future Microbiol.** (2015) 10(6), 917–927.

TEODORO, G. R. **Atividade da fração enriquecida em fenólicos de *Buchenavia tomentosa* e de algumas substâncias isoladas antes e após encapsulação com beta-ciclodextrina em *Candida albicans*.** Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2016.

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.

YOUSUF, S.; AHMAD, A.; KHAN, A.; MANZOOR, N.; KHAN, L.A. Effect of garlic-derived allyl sulphides on morphogenesis and hydrolytic enzyme secretion in *Candida albicans*. **Med mycol.** 2011.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo permitem concluir que, os extratos da *B. tetraphylla* na triagem fitoquímica, mostrou a presença de hidrocarbonetos, açúcares, glicosídeos, terpenos, taninos e flavonóides. Os extratos e frações testados da *B. tetraphylla*, apresentaram atividade antifúngica, sendo o extrato metanólico e a fração I que obtiveram maior atividade frente ao micro-organismo *C. albicans*. O extrato metanólico da *B. tetraphylla* não apresentou efeito citotóxico em eritrócitos humanos nas concentrações testadas. Além de induzir importantes alterações morfológicas nas células tratadas. A fração I apresentou um grande potencial na inibição dos fatores de virulências testados neste trabalho. Podendo apresentar promissores antifúngicos no tratamento contra *C. albicans*.

REFERÊNCIAS

- ACHARYYA, S.; SARKAR, P.; SAHA, D. R.; PATRA, A.; RAMAMURTHY, T.; BAG, P. K. Intracellular and membrane-damaging activities of methyl gallate isolated from *Terminalia chebula* against multidrug-resistant *Shigella* spp. **Journal of medical microbiology**, v. 64, n. 8, p. 901-909, 2015.
- 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 journal 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.
- AHMADEY, Z. Z. A.-; MOHAMED, S. A. Vulvovaginal candidiasis: agents and its virulence. **Microbiology Research International**, v. 2, n. September, p. 1–23, 2014.
- AIRES, A.; DIAS, C.; CARVALHO, R.; SAAVEDRA, M. J. Analysis of glycosylated flavonoids extracted from sweet-cherry stems, as antibacterial agents against pathogenic *Escherichia Coli* isolates. **Acta biochimica polonica**, 2017.
- ALBUQUERQUE, U. P. A **etnobotânica no nordeste brasileiro**. In: CAVALCANTI, T. B. E WALTER, B. M. T. **Tópicos atuais em Botânica**. Brasília: EMBRAPA, São Paulo. Sociedade Botânica do Brasil, p. 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**, v. 26, n. 7, p. 336-346, 2002.
- ALBUQUERQUE, U. P. D.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista brasileira de farmacognosia**. v. 16, p. 678-689, 2006.
- ALI KHAN, M. S.; NAZAN, S.; MAT JAIS, A. M. Flavonoids and antioxidant activity mediated gastroprotective action of Leathery Murdah, *Terminalia coriacea* (Roxb.) Wight & Arn. Leaf methanolic extract in rats. **Arquivos de Gastroenterologia**, 2017.

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**. v. 26, n. 6, p. 276- 285. 2002.

ALMEIDA, C.F.C.B.R., RAMOS, M.A., AMORIM, E.L.C. and ALBUQUERQUE,U.P.A Comparison of knowledge about medicinal plants for three rural communities in the semi-arid region of Northeast of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 674-684, 2010.

ALVES, H. M. A. Diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. Cadernos temáticos. **Química Nova na Escola**, v.3, 10-15, 2001.

ALVES, E. O.; MOTAJ, 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 BotanicaBrasilica**. 16:189-203.

ANVISA. 2014. Relatório epidemiológico das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). Disponível: https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/images/documentos/Relatorio_Epid_Curitiba_Pr_2014.pdf

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

ARAÚJO, F. M. et al. Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Croton heliotropiifolius* Kunth from Amargosa, Bahia, Brazil. **Industrial Crops and Products**. v. 105, p. 203-206, 2017.

AWAD, E.; AWAAD, A. Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. **Fish & Shellfish Immunology**, 2017.

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.

BARROS, V. F. de, MENEZES, J. E. de. Análise estatística do risco de morte por infecção hospitalar em Goiânia. **Rev Elet em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**. 2012;8(8):1581-1590.

BARROS, P. P. et al. Influence of *Candida krusei* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* gene expression in vitro biofilms. **Archives of Oral Biology**, v. 64, p. 92– 101, 2016.

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

BERNARDES, N. R., PESSANHA, F. F., OLIVEIRA, D. B. Alimentos Funcionais: Uma breve revisão. **CIÊNCIA E CULTURA - Revista Científica Multidisciplinar do Centro Universitário da FEB** v. 6, nº 2. 2010.

BONIFACE, P. K; BAPTISTA, S. F.; KAISER, C. Current state of knowledge on the traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of the genus *Hymenaea*. **Journal of Ethnopharmacology**, 2017.

BRADFORD, L. L.; RAVEL, J. The vaginal mycobiome: A contemporary perspective on fungi in women's health and diseases. **Virulence**, v. 8, n. 3, p. 342–351, 2017. Taylor & Francis.

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.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N°26, de 13 de maio de 2014 – Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2014.

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.

CAMARGO, L. R. P.; SUFFREDINI, I. B. Anti-Escherichia activity of Brazilian plant extracts. **Arq. Bras. Med.. vet. Zootec.** V.66, n2. 2014.

CAMPOS, Rosana. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA PALMATINA FRENTE A ISOLADOS DE CANDIDA SPP. RESISTENTES A AZÓLICOS E SUA ATIVIDADE CONTRA BIOFILME FORMADO E EM FORMAÇÃO / Rosana Campos. – 2017.

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.

CASSONE, A. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 122, n. 6, p. 785–794, 2015.

CAUCHIE, M.; DESMET, S.; LAGROU, K. *Candida* and its dual lifestyle as a commensal and a pathogen. **Research in microbiology**. n. March, p. 1–9, 2017.

CAVALCANTI FILHO, J. R. N.; SILVA, T. F.; NOBRE, W. Q.; OLIVEIRA DE SOUZA; L. I., SILVA E SILVA FIGUEIREDO, C. S.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. D.; GUSMÃO, N. B.; SILVA, M.V.; DA SILVA, L.C.N.; CORREIA, M. T. D. S.

Antimicrobial activity of *Buchenavia tetraphylla* against *Candida albicans* strains isolated from vaginal secretions. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1521-1527, 2017.

- 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
- CHIN, V.K.; LEE, T.Y.; RUSLIZA, B.; CHONG, P.P. Dissecting *Candida albicans* Infection from the Perspective of *C. albicans* Virulence and Omics Approaches on Host– Pathogen Interaction: A Review. **Int J Mol Sci**. 2016; 17 (10): 1643.
- CIRLA, A.; MANN, J. Combretastatins: from natural products to drug Discovery. **Natural Product Reports**. V. 20, p. 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.; GUIMARÃES, T.; CAMARGO, L. F. A.; et al. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 283–312, 2013. Elsevier Editora Ltda.
- CORDEIRO, C. H. G., SACRAMENTO, L. V. S., CORRÊA, M. A., PIZZOLITTO, A. C., BUAAB, T. M. Análise farmacognóstica e a atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para higiene bucal. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n.3, p. 395-404. 2013.
- COSTA, C.R.. **Fatores de virulência de isolados de *Candida* de pacientes imunocomprometidos: caracterização molecular de *Candida albicans* suscetíveis e resistentes ao fluconazol** [Tese]. Goiânia (GO): Universidade Federal de Goiás; 2009.
- RISEO, G.; SCORDINO, F.; ROMEO, O. Current methods for identifying clinically important cryptic *Candida* species. **Journal of Microbiological Methods**, v. 111, p. 50– 56, 2015.

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 series study. **BMJ Open**: e000992.

DEWICK, P. M. The mevalonate and methylerythritol phosphate pathways: terpenoids and steroids. In: **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3 ed, chichester: John Wiley & Sons, 2009. Cap. 5, p. 187-306.

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

DOI, A. M.; CARLOS, A.; PIGNATARI, C.; et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **PLoS ONE**, p. 1–9, 2016.

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.

FARKAS, J.; MOHÁCSI-FARKAS, C. History and future of food irradiation. **Trends in food Science & technology**, Cambridge, v 22, n 2-3, p. 121-126, 2011.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Química Nova**, V. 33, N.9, P.1829, 2010.

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

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

FYHRQUIST, P.; MWASUMBI, L.; HAEGGSTROM, 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.

- GARCIA, A. A., CARRIL, E. P-U. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca** (biologia). Serie fisiologia vegetal, Madrid, v. 2, n.3, p. 119-145, 2009.
- GASPAR, M. D. R.; BUSATO, C.R.; SEVERO, E. Prevalência de infecções hospitalares em um hospital geral de alta complexidade no município de Ponta Grossa. **Acta Scientiarum**. 2012;34(1):23-29.
- GERALDINO, T. H. et al. Dimorphism, functional enzymes production and adhesins of *Candida albicans*: a mini review. **Biosaúde**, Lodrina, v. 14, n.1, 2012.
- GHANNOUM, M.A.; RADWANN, S.S. **Candida adherence to epithelial cells**. CRC Press – Boston, 1990.
- 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.
- GOBBO- NETO, L., LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n.2, p. 374-381, 2007.
- GUEDES, V. R. **Estudo fitoquímico do extrato heânico e dos óleos voláteis de *Acriptopappus micropappus***. 2004. 162 p. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2004.
- GULATI, M.; NOBILE, C. J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microbes and Infection**, doi: 10.1016/j.micinf.2016.01.002, 2016.
- HASAN, F. et al. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. **Microbes Infect.** 11(8-9):753-761, 2009.

HARTMANN, A. et al. Incidência De Candida Spp. Na Mucosa Oral de pacientes infectados Pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (Hiv) no Município de Santo Ângelo-RS. **R Epidemiol Control Infec**, Santa Cruz do Sul, 6(3):125-130, 2016. [ISSN 2238-3360].

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

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.

HORST, H. **Análise química e biológica dos constituintes fenólicos de *Croton celtidifolius baill.*** 2008. 79 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciência Físicas e Matemáticas – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

ISHIDA, K.; UEDA-YAMAGUCHI, M.; YAMADA-OGATTA, S. F.; et al. Characterization of Candida spp. isolated from vaginal fluid: identification, antifungal susceptibility, and virulence profile. *Acta Scientiarum. Health Science*, v. 35, p. 1–8, 2013.

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

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.

JOHNSTON, Graham. A. R. Flavonoid nutraceuticals and ionotropic receptors for the inhibitory neurotransmitter GABA. **Neurochemistry International** 89.P. 120e125. 2015.

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.

KAPOOR, D.; VIJAYVERGIYA, R.; DHAWAN, V. Terminalia arjuna in coronary artery disease: Ethnopharmacology, pre-clinical, clinical & safety evaluation. **Journal of ethnopharmacology**, v. 155, n. 2, p. 1029-1045, 2014.

KOIRALA NIRANJAN, THUAN NGUYEN HUY, GHIMIRE GOPAL PRASAD, THANG DUONG VAN, SOHNG JAE KYUNG. Methylation of flavonoids: chemical structures, bioactivities, progress and perspectives for biotechnological production. **Enzyme and Microbial Technology**. 2016.

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.

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.

LEE, D. Y.; KIM, H. W.; YANG, H.; SUNG, S. H. Hydrolyzable tannins from the fruits of Terminalia chebula Retz and their α -glucosidase inhibitory activities. **Phytochemistry**, v. 137, p. 109-116, 2017.

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.

LOOMIS, W. D. et al. Biochemistry of terpenoids. **Lipids: structure and function: the biochemistry of plants**. Elsevier, 2014;

LOPES, R. M., OLIVEIRA, T. T., NAGEM, T. J., PINTO, A. S. Flavonóides. Farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília – DF, ano 3, n. 17, p. 18-22, 2000.

LÓPEZ, C. A. A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, 1(1):19-27. 2006.

LORENA O. FELIPE E JULIANO L. BICAS. Terpenos, aromas e a química de produtos naturais. **Química nova escola**. Vol. 39, Nº 2, p. 120-130, MAIO. 2017.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. **Nova Odessa**, São Paulo: Instituto Plantarum. 2002.

MAHABIR, D.; GULLIFORD, M.G. (1997). Use of medicinal plants for diabetes in Trinidad and Tobago. **Revista Panamericana de Salud Publica**. 1:74-79.

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.

MARISCO, G.; PUNGARTNIK, C. *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae): traditional uses, chemical composition and biological activities. **Scientia Amazonia** v.4, p. 10-18, 2015.

MARQUETE, N.; LOIOLA, M.I.B. **Combretaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB90>. 2015.

MARQUETE, N. F. S.; VALENTE, N. M. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Combrateceae. **Rodriguésia**. V. 56, p. 58-66, 2008.

MARQUETE, N.; LOIOLA, M.I.B. **Combretaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB90>. 2015.

MCGAW, L. J.; RABE, T.; SPARG, S. G.; JAGER, 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.

MCMURRY, J. 7º Ed. **Química Orgânica - Combo**. São Paulo: Cengage Learning, 1344. 2011.

MENDES-PINTO, T. J. et al. First record of *platemys platycephala melanonota* ERNST, 1984 for the brazilian amazona. **Revista de ciências ambientais**, v.5, n.2. 2011.

MOHAMMAD, T.; MATSUDA, H.; YOSHIKAWA, M. A. Review of antioxidant flavonoids in formalin-induced mice paw inflammation; of mitochondrial sorbitol dehydrogenase activity. **Journal of Biochemical and Molecular toxicology**, 2017.

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.

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.

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**, v. 2012, 2012.

OLIVEIRA, SUZANE K. R.; ANJOS, D. C. DOS; GONCALVES, L. H.; et al. Prevalence and production of enzymes by Candida isolates from vaginal secretion samples. **Revista de Patologia Tropical**, v. 42, n. 2, p. 161–176, 2013.

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

PETROVSKA, BB. Historical review of medicinal plants usage. **Phcog rev**. 6: 1-5. 2012.

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, p90-99, 2006.
- POZZY, A. C. S. **Desenvolvimento de método espectrofotométricos de análise de flavonóides do maracujá**. Dissertação de mestrado da USP. SÃO PAULO. 2007
- 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.
- RAI, L.S., SINGHA, R., BRAHMA,P., SANYAL, K. Epigenetic determinants of phenotypic plasticity in candida albicans. **Fungal Biology Reviews**, v.32, p. 10-19, 2010.
- 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.
- RAVINDRA, N.S., KULKARNI, R.N. Essential oil yield and quality in rose-scented geranium: Variation among clones and plant parts. **Scientia Horticulturae**. v. 184, p. 31–35, 2015.
- 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.
- SALEEM, A.; HUSHEEM, M.; HARKONEN, P.; PIHLAJA, K. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* retz. **Journal of ethnopharmacology**, v. 81, p 327-336. 2002.
- SAMPAIO, E. V. S. B.; GIULLETTI, A. M.; VÍRGINIO, J.; GAMARRA-ROJAS, C. F. L. Vegetação e flora da Caatinga. **Recife: associação plantas do nordeste**. P. 176. 2002.

- SAVI, PATRICIA, R. S. Análise de flavonoides totais presentes em algumas frutas e hortaliças convencionais e orgânicas mais consumidas na região Sul do Brasil. **Demetra: alimentação, nutrição e saúde**. 12(1); 275-287. 2017.
- SELITRENNIKOFF, C. P. Antifungal Proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, 67 (7): 2883-2894, 2001.
- SHAKYA, P.; MARSLIN, G.; SIRAM, K.; BEERHUES, L.; FRANKLIN, G. Elicitation as a tool to improve the profiles of high- value secondary metabolites and pharmacological properties of *Hypericum perforatum*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2017.
- SHER, A. Antimicrobial activity of Natural products from Medicinal Plants. **Gomal Journal of Medical Sciencies**. V. 7, n. 1, p. 72-28. 2009.
- SILVA, L. P.; DE ANGELIS, C. D.; BONAMIN, F.; KUSHIMA, H.; MININEL, F. J.; DOS SANTOS, L. C.; Dellela F. K.; FELISBINO, S. L.; VILEGAS, W.; DA ROCHA, R. M.; DOS SANTOS RAMOS, M. A.; BAUAB, T. M.; TOMA, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. A medicinal plant from the Caribbean pharmacopeia with anti-*Helicobacter pylori* and antiulcer action in experimental rodent models. **Journal of ethnopharmacology**, v. 159, p. 285-295, 2015.
- SILVA, P. L. N. Relação de custo-benefício na prevenção e no controle das infecções relacionadas à assistência à saúde em uma unidade de terapia intensiva neonatal. **J. Health Biol. Sci.** 2017; 5(2):142-149.
- 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.
- SILVA, G. A.; LIMA, W. Q. F.; GUEDES, A. S.; RODRIGUÉZ, J. A. L. Avaliação da letalidade e atividade antimicrobiana de extratos de folhas de *Spondias mombin aff. Tuberosa*. **Revista Facider**, v1, p.1-18, 2012.
- SILVA, C. P. *Poiretia latifolia e Poiretia tetraphylla: estudo dos óleos voláteis e atividades biológicas premiliares*. 2005. 120f. Dissertação Mestrado em química) – Centro de Ciências Naturais e Exatas, UFSM, Santa Maria, 2005.

SILVA, A. C. O.; LIMA, R. A. Identificação das classes de metabólitos secundários no extrato etanólico dos frutos e folhas de *Eugenia uniflora* L. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 20, n. 1, p. 381–388, 2016.

SILVA, D. G. **Isolamento e caracterização do óleo essencial da *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Erva cidreira) e investigação da atividade biológica**. 2008. 55f. trabalho de conclusão de curso (graduação)- departamento de Química, UFSC, 2008.

SILVELLO, C. L. C. **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.

SHAKYA, P.; MARSLIN, G.; SIRAM, K.; BEERHUES, L.; FRANKLIN, G. Elicitation as a tool to improve the profiles of high- value secondary metabolites and pharmacological properties of *Hypericum perforatum*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2017.

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.

TRETIN, DANIELA, S. et al. MEDICINAL PLANTS FROM BRAZILIAN CAATINGA: ANTIBIOFILM AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES AGAINST *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Caatinga**. v. 27, n. 3. 2014.

VALENTÍN, A. et al. Voriconazole inhibits biofilm formation in different species of the genus *Candida*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 10, p. 2418- 23, 2012.

VAZQUEZ, J. et al. Evaluation of an early step-down strategy from intravenous anidulafunfin to oral azole therapy for the treatment of candidemia and other forms of invasive candidiasis: results from an open-label trial. **BMC Infectious Diseases**, 2014.

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

VERMELHO, A. B. et al. **BACTERIOLOGIA GERAL**. RIO DE JANEIRO: GUANABARA KOOGAN, 2007.

VIEIRA, P.D.B., et al. Caatinga plants: Natural and semi-synthetic compounds potentially active against *Trichomonas vaginalis*, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** (2016)

VIZZOTO, M., KROLOW, A. C., WEBER, G. E. B. **Metabólitos Secundários encontrados em plantas e sua importância**. EMBRAPA: Clima Temperado. Pelotas, RS, 2010.

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.

YILDIRIM, ISIL, KUTLU, TURKAN. Anticancer Agents: Saponin and Tannin. **International Journal of Biological Chemistry** 9 (6): 332-340, 2015

YU, H. et al. Assessing the potential of four cathelicidins for the management of mouse candidiasis and *Candida albicans* biofilms. **Biochimie**, v. 121, p. 268- 77, 2016.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.449-484.

ZIELINSKI, A. A. F., et al. (2014a). A comparative study of the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. **Food Research International**, 60, 246-254. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.010>

ZIELINSKI, A. A. F., et al. (2014b). Chemical composition, sensory properties, provenance, and bioactivity of fruit juices as assessed by chemometrics: a critical review and guideline. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 13(3), 300-316. [http:// dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12060](http://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12060)