

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE CENTRO DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AGROALIMENTAR PROGRAMA DE
POS GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM SISTEMAS
AGROINDUSTRIAIS**

KARLA BREHND A CABRAL LIBERATO

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DE PLANTAS DO
SEMIÁRIDO PARAIBANO FRENTE A LEVEDURAS DO GÊNERO
CANDIDA**

**POMBAL - PB
2018**

KARLA BREHND A CABRAL LIBERATO

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DE
PLANTAS DO SEMIÁRIDO PARAIBANO FRENTE A
LEVEDURAS DO GÊNERO CANDIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Sistemas Agroindustriais da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Sistemas Agroindustriais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sc. Alfredina dos Santos Araújo

Área de concentração: Ciência e tecnologia de alimentos

**POMBAL – PB
2018**

L695a

Liberato, Karla Brehnda Cabral.

Atividade antifúngica de extratos de plantas do Semiárido Paraibano frente a leveduras do gênero *Candida* / Karla Brehnda Cabral Liberato Liberato. - Pombal - PB, 2018.

41 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, 2018.

"Orientação: Profa. Dra. Alfredina dos Santos Araújo".

Referências.

1. Extratos Naturais. 2. Agentes Antifúngicos. 3. *Hibiscus Rosa-sinensis* L.. 4. *Mimosa tenuiflora*. 5. *Anacardium Occidentale*. I. Araújo, Alfredina dos Santos. II. Título.

CDU 579.2(043)

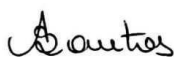
CAMPUS DE POMBAL

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATO DE PLANTAS DO SEMIÁRIDO PARAIBANO FRENTE A LEVEDURAS DO GÊNERO CÂNDIDA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais do Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar da Universidade Federal de Campina Grande, Campus Pombal-PB, em cumprimento às exigências para obtenção do Título de Mestre (M.Sc.) em Sistemas Agroindustriais.

Aprovada em 28/02/2018

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof.ª D.Sc. Alfredina dos Santos Araújo
Orientadora



Prof. D.Sc. Everton Vieira da Silva
Examinador Interno



Prof. D.Sc. João Paulo Natalino de Sá
Examinador Externo

Pombal - PB, 28 de fevereiro de 2018

A meus Pais,
por sempre acreditarem em mim,
pelo incentivo e apoio.

RESUMO

O gênero *Candida* é constituído por patógenos oportunistas que vivem comumente na microbiota normal do homem e animal. Alguns fatores podem contribuir a ruptura dessa relação de simbiose, havendo um aumento na multiplicação e invasão dos tecidos causando infecção no hospedeiro, devido a alterações imunológicas, químicas, e mecânicas que se processem. O surgimento e a disseminação de microrganismos resistentes a drogas antifúngicas disponíveis no mercado, impulsiona a pesquisa por novas fontes de substâncias com atividades antimicrobianas que se façam eficazes. A análise de produtos naturais é essencial para a descoberta de novos alvos para a elaboração de agentes antimicrobianos. Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica do extrato de *Hibiscus rosa-sinensis* L., *Mimosa tenuiflora* e *Anacardium occidentale* sobre leveduras do gênero *Candida* incluindo *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. famata*, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*. Os testes foram realizados em de cepas padrões obtidas através de doação da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), através de inóculos, a partir de culturas recentes dos microrganismos. Através do macerado hidroalcoólico das plantas obteve-se o extrato bruto que foram testado nas culturas. O extrato de *Mimosa tenuiflora* demonstrou melhor efeito inibitório frente a cepa *C. famata*, e Concentração Inibitória Mínima (CIM) na diluição de 25%, enquanto o extrato de *Anacardium occidentale* apresentou o menor valor de CIM frente a cepa *C. albicans* na diluição de 12,5%. Entretanto, o extrato de *Hibiscus rosa-sinensis* L. apresentou inatividade antifúngica contra todas as leveduras testadas. Indica-se, as plantas com potencial antifúngico, para posteriores estudos que indetifiquem a(s) fração(ões) ativa(s), para obtenção de formas farmacêuticas naturais viáveis contra as referidas espécies de *Candida* estudadas.

Palavras-chave: Extratos naturais, Agentes antifúngicos, *Hibiscus rosa-sinensis* L, *Mimosa tenuiflora*, *Anacardium occidentale*.

ABSTRACT

The genus *Candida* is composed of opportunistic pathogens that live in the normal microbiota of humans and animals. Some factors may contribute to the rupture of the symbiosis relationship; this can lead to an increase in multiplication and invasion of the tissue causing infection in the host, thanks to immunological, chemical, and mechanical changes. The emergence and spread of microorganisms resistant to antifungal drugs, which are available on the market stimulates researches for new sources of substances that present efficient antimicrobial activities. Analysis of natural substances is essential for the discovery of new methods for the development of antimicrobial agents. This study aims to evaluate the antifungal activity of the extract of *Hibiscus rosa-sinensis* Linn, *Mimosa tenuiflora*, and *Anacardium occidentale* on yeasts of the genus *Candida* including *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. famata*, *C. metapsilosis*, and *C. orthopsilosis*. The Foundation known in Brazil as the Oswaldo Cruz Foundation (in Brazilian acronym: Fiocruz) had donated standard stains used in the test which were developed by inoculum from recent cultures of the microorganisms. Through the hydroalcoholic macerate of the plants, the crude extract was obtained which was tested in the cultures. The research of extracts of *Mimosa tenuiflora* and *Anacardium occidentale* presented to be active against the tested species. The extract of *Mimosa tenuiflora* presented a better inhibitory effect against the *C. famata* strain, and Minimal Inhibitory Concentration (MIC) at the dilution of 25%, while the extract of *Anacardium occidentale* presented the lowest value of MIC against *C. albicans* strain at the dilution of 12.5. It is indicated the plants with antifungal potential, for further studies that it may identifies one or more active fractions to obtain viable natural pharmaceutical forms against the mentioned *Candida* species.

Keywords: Natural extracts, antifungal activity, *Hibiscus rosa-sinensis* L, *Mimosa tenuiflora*, *Anacardium occidentale*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - – Desenvolvimento de halo de 19 mm da espécie de <i>Candida famata</i> frente ao extrato de <i>Anacardium occidentale</i> (100%)	30
Figura 2 – Determinação de resistência por falta de desenvolvimento de halo das espécies de <i>Candida</i> testadas frente ao extrato de <i>Hibiscus rosa-sinense</i>	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Registro dos tamanhos de halos formados pelas espécies ensaiadas de acordo com as concentrações inibitórias mínimas frente ao extrato hidroalcoólico de <i>Anacardium occidentale</i> e ao fluconazol	28
Tabela 2 – Registro dos tamanhos de halos formados pelas espécies ensaiadas de acordo com as concentrações inibitórias mínimas frente ao extrato hidroalcoólico de e <i>Mimosa tenuiflora</i> ao fluconazol.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
CCTA	Centro de Ciência e Tecnologia Agroalimentar
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CVT	Centro Vocacional Tecnológico
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
UCI	Unidade de Cuidados Intencivos

SUMÁRIO

RESUMO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
3.1 Infecções fungicas	13
3.2. <i>Candida spp</i>	13
3.2.1 Fatores de virulência e patogenicidade	15
3.2.2 Identificação e diagnóstico	17
3.2.3 Resistência microbiológica	18
3.2.4 Tratamento	19
3.3 Tratamento com fitoterapicos	20
3.4 Aspectos gerais do <i>Hibiscus</i>	21
3.5 <i>Mimosa tenuiflora</i>	22
3.6 <i>Anacardium occidentale</i>	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Cepas fungicas	24
4.2 Espécies vegetais	25
4.3 Obtenção do extrato hidroalcoólico de <i>Anacardium occidentale e Mimosa tenuiflora</i>	25
4.4 Obtenção do extrato hidroalcoólico do hibiscus	25
4.5 Testes de susceptibilidade antifúngica	25
4.5.1 Teste de difusão em disco	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
5.1 determinação da atividade antifungica dos extratos hidroalcoólicos	28
6. CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

As leveduras do gênero *Candida* spp. fazem parte da microbiota normal da pele, boca, trato gastrointestinal e trato geniturinário. Porém, estes micro-organismos comensais tornam-se patogênicos caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro, podendo causar doença no homem por invasão tecidual, por indução de estados de hipersensibilidade ou por produção de toxinas. *Candida* spp são unicelulares e apresentam mecanismo de reprodução assexuada e podem apresentar diferentes morfologias. (SIMÕES *et al.*, 2013; PEIXOTO *et al.*, 20014).

A principal espécie do gênero *Candida* de interesse clínico é *C. albicans*, porém, tem se descrito aumento progressivo de casos de doenças superficiais e invasivas envolvendo isolamentos de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitanae* e *C. dubliniensis*, entre outras. (LUTZ, *et al.*, 2013).

Estas leveduras podem invadir tecidos profundos, como o sangue, provocando candidíase sistêmica, porém costumam infectar a pele e as membranas mucosas, como as que revestem a boca e a vagina (SANTANA, *et al.*, 2013). Essa infecção é mais frequente e se agrava em pessoas imunodeprimidas, como portadores do vírus HIV e pacientes tratados com quimioterapia, além dos que permanecem longos períodos em unidades de terapia intensiva (SIQUEIRA, *et al.*, 2014).

O tratamento da *Candida* tornou-se um desafio, devido à natureza eucariótica das células fúngicas, que são similares às células hospedeiras, além da ocorrência de fatores de virulência que favorecem a resistência de algumas cepas aos antifúngicos convencionais, principalmente em indivíduos imunodeprimidos (MENEZES *et al.*, 2009; ENDO *et al.*, 2010). Nesse cenário, com a emergente resistência a múltiplas drogas contra as candidíases e o pequeno número de classes antifúngicas disponíveis no mercado, torna-se necessária a descoberta de novos agentes terapêuticos oriundos de outras fontes, como as plantas medicinais. Essa pesquisa tem como objetivo avaliar a atividade antifúngica de extratos frente as cepas de *Cândida* de interesse médico.

Sabe-se que o agente causador das candidíases e candidemias encontram-se comensalmente na microbiota dos seres humanos e animais, no entanto por vezes é capaz de colonizar a pele humana, disseminando-se por via hematogênica, podendo comprometer diferentes órgãos e que comumente, a intervenção terapêutica fundamenta-se no uso

prolongado do mesmo antifúngico de maneira empírica, nem sempre sendo efetivos além de apresentarem toxicidade, podem também causar recorrência ou resistência. Há uma busca contínua de novos fármacos antifúngicos mais potentes e mais seguros que os disponíveis, dentre esses as plantas medicinais apresenta grande potencial farmacológico devidas as inúmeras atividades biológicas já comprovadas podendo assim auxiliar no tratamento.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antifúngica de extratos hidroalcolólicos de plantas típicas do semiárido em cepas de *Candida*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar *in vitro* a atividade antifúngica de *Anacardium occidentale*, *Mimosa tenuiflora* e do *Hibiscus rosa-sinensis* L, sobre cepas padrões de *Candida*;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos testados que apresentarem atividade antifúngica;
- Realizar um screening para servir como guia na seleção de plantas com atividade antifúngica.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Infecções fungicas

A ocorrência de infecções fungicas humanas vem, ao longo dos últimos anos, apresentando um crescimento significativo. As principais infecções responsáveis por esse aumento são as dermatomicoses. Esse aumento está relacionado a diversos fatores, como: o uso de medicamentos imunossupressores (empregados por vezes de forma excessiva, concedendo a instalação de microorganismos convencionalmente saprófitos), o aumento da sobrevivência de pacientes com doenças imunossupressoras e o melhor diagnóstico laboratorial e clínico (FENNER, 2006).

Os principais agentes dessas infecções podem ser fungos patógenos (*Epidermophyton spp.*, *Microsporum sp*, *Trichophyton sp*, *Paracoccidioides sp* e *Histoplasma sp*) ou fungos patógenos oportunistas (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*), que por sua vez tem se tornado um grande problema clínico nas últimas décadas (MORSCHHÄUSER, 2010).

Quanto ao tratamento, há uma busca contínua de novos princípios ativos antifúngicos mais eficientes e seguros que os convencionais, pois os existentes não são sempre efetivos, dado que apresentarem importante toxicidade, além de causarem recorrência ou resistência (FENNER, 2006)

A partir de 1970 a incidência e frequência dessas infecções vêm aumentando, tendo a *Cândida* como uma das principais causas de infecções nosocomiais sistêmicas, ocasionando alta mortalidade e problemas sócio-econômicos em função do maior tempo de hospitalização, com consequente aumento dos custos com o tratamento do paciente. (VIDIGAL; SVIDZINSKI, 2009).

3.2 *Candida spp*

O gênero *Candida* apresenta-se na forma de levedura, esses representantes de acordo com sua classificação taxonomica pertencem ao Reino Fungi, divisão Eumycota, filo Ascomycota, classe Deuteromycetes, ordem Cryptococcales e fazem parte da família Cryptococcaceae (KURTZMAN; FELL, 1998; LACAZ *et al.*, 2002).

Candida são comumente saprofiticas, unicelulares, pleomórficas, aproximadamente 150 espécies, dentre elas 20 descritas como agentes etiológicos dos casos de candidíases (LACAZ et al., 2002; SUGITA et al., 2004). Apenas 10% tem sua patogenicidade aos seres humanos reconhecida, dentre elas pode-se destacar *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (ALMEIDA, 2013). A *Candida albicans*, é a levedura que mais comumente causa infecções fúngicas (PIETRELLA et al., 2011). Mesmo com poucas publicações recentes no Brasil, trabalhos mais antigos já relatavam a *C. parapsilosis* como a segunda espécie não-albicans de *Candida* mais frequentemente isolada a partir de amostras clínicas, atrás apenas da *C. tropicalis*. Contudo, têm sido descrito um número progressivo de casos de doenças invasivas e superficiais relacionadas e espécies envolvendo isolamentos de *Candida fumata*. (CASTRO, 2006).

C. tropicalis é particularmente virulento em hospedeiros, ficando em segundo lugar entre os não albicans *Candida* espécies. Tendem a causar fungemia em pacientes com câncer, neutropenia, malignidade ou transplante de medula óssea. As características clínicas dos pacientes com candidemia causada por *C. tropicalis* são mal definidas e geralmente tendenciosas pela seleção desses grupos específicos (MUNOZ, et al., 2011; JIANG, et al., 2012).

Comensal da pele humana e unhas, *C. parapsilosis* representa-se como uma ameaça para os doentes hospitalizados em Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), que necessitam de dispositivos médicos e intervenções constantes dos profissionais de saúde. Trata-se de um dos fungos mais frequentemente isolados de manipuladores m, sendo um dos principais vetores de aquisição exógena de *C. parapsilosis* (BONASSOLI et al., 2005; TROFA et al., 2008).

Em 1980, documentou-se uma alta incidência de *C. parapsilosis* como agente etiológico das infecções hospitalares, excedendo as taxas de *C. albicans*, em uma instituição no Texas, dando início a uma investigação para ver a possibilidade de um surto de uma única fonte, onde foram obtidos os perfis isoenzimáticos dos isolados de *C. parapsilosis*. Os resultados mostraram que havia três grupos geneticamente distintos de *C. parapsilosis* entre os isolados clínicos, e não um como se esperava inicialmente, com diferenças suficientes que os levaram à separação em três grupos *C. parapsilosis* sensu stricto, *Candida orthopsilosis*, e *Candida metapsilosis* que são, até o momento, fenotipicamente indistinguíveis (LIN et al., 1995; TAVANTI et al., 2005).

Na Candidose intertriginosa observam-se lesões eritematosas, com superfície úmida e secretante, levando ao aparecimento de fissuras. A lesão principal é geralmente cercada por lesões satélites (lesões menores). Ocorrem caracteristicamente em dobras cutâneas

(axilas, regiões submamárias, ínguino-crurais e interdigitais). Podendo haver prurido local (MINELLI; NEME; PRADO, 2003).

Candidíase vulvovaginal (VVC) caracteriza-se por uma infecção da mucosa genital por leveduras *Candida*, que comprometem principalmente a vulva e a vagina. Ocorrem endogenamente devido predisponentes fatores que favorecem a multiplicação. São comuns alguns sinais e sintomas, como coceira, queimando, rachaduras, eritema e edema vulvar, leucorreia e a presença de placas esbranquiçadas na mucosa vaginal. A Candidíase VVC é uma das causas mais comuns de infecção genital em mulheres em idade reprodutiva. Sua incidência exata é desconhecida, embora represente um problema de importância global em saúde pública (BRANDOLT *et al*, 2017).

A candidíase bucal atinge principalmente pacientes com quadros de imunodepressão. Apresenta formas clínicas como pseudomembranosa conhecida como “sapinho”, caracterizado por placas brancas na cavidade bucal. Outra forma clínica é a quelite angular que manifesta um edema discreto ou fissura, caracterizado como um processo inflamatório no ângulo do lábio (FORNARI *et al*, 2013).

Dentre as várias apresentações clínicas, esse fungo pode causar desde um comprometimento limitado ao tecido mucocutâneo a infecções invasivas extremamente graves. A candidíase sistêmica afeta principalmente pacientes submetidos a drogas imunossupressoras e procedimentos invasivos, com altos índices de mortalidade (AIKAWAA *et al*, 2015).

3.2.1 Fatores de virulência e patogenicidade

Esse microrganismo provoca lesões celulares devido à ação no rompimento de barreiras de tecido conjuntivo. Sua virulência está relacionada com sua capacidade de adesão e secreção de diversas enzimas, que hidrolisam as proteínas do hospedeiro e contribuem para esse rompimento. Tem como principais fatores de virulência a produção de enzimas extracelulares tais como: proteinase e fosfolipase, o fenômeno da aderência (adesinas), além da capacidade de formação de pseudo-hifas, variabilidade fenotípica e produção de toxinas. Já a sua patogenicidade está relacionada à transformação de um morfotipo a outro, no caso, levedura a hifas. Tais mudanças fenotípicas permitem uma rápida adaptação a alterações em seu microambiente facilitando a sobrevivência, a invasão

de tecidos e o escape do sistema imunológico, contribuindo assim para a virulência. (FORNARI, 2013).

A presença de receptores específicos na membrana citoplasmática são necessários para a fixação e penetração intracelular do fungo. Fatores como a formação do tubo germinativo, disponibilidade de carboidratos, pH, temperatura, produção de fosfolipases, de proteases e de outras enzimas extracelulares, influenciam a adesão as superfícies celulares do hospedeiro. O mecanismo de aderência envolve glicoproteínas, proteínas do tipo lectinas que apresentam a capacidade de identificar vários tipos de açúcares e receptores para a fração C3b do sistema complemento. Por parte do hospedeiro, receptores celulares favorecem a colonização da matriz extracelular para as adesinas de *Candida* como: fibrina, fibronectina e laminina (SANTANA *et al.*, 2013).

Enzimas fosfolipases estão presentes na superfície da levedura propiciando a lesão tecidual por danificação dos constituintes lipídicos da membrana celular do hospedeiro. Essas enzimas são capazes de degradar fosfolipídios, sendo este o maior componente da membrana biológica, podendo ser encontrado em animais, plantas e bactérias. Os isolados que possuem altas quantidades de fosfolipases apresentam uma maior capacidade de aderência e invasão (HARTMANN *et al.*, 2016).

Os genes denominados Secreted aspartyl proteinases (Saps) são responsáveis pela secreção de proteínases, facilitando a invasão e colonização de tecidos dos hospedeiros pela ruptura das mucosas e degradando importantes proteínas de defesa imunológica e estrutural. Já foram identificados dez genes Saps em *C. albicans*, quatro em *C. tropicalis*, três em *C. Parapsilosis* e nenhum em *C. glabrata* e em outras espécies. (BRANCO, 2012).

O fenômeno de switching expressa a variabilidade fenotípica das candidas, além disso pode ser caracterizada pela alta frequência, reversibilidade e por demonstrar diferenças nas propriedades de superfície celular e nos aspectos morfológicos das colônias fúngicas, levando a alteração na aderência às células epiteliais, na suscetibilidade antifúngica e na atividade fungicida de neutrófilos. Suas colônias mudam de aparência assumindo diferentes formas, incluindo forma lisa, áspera, forma de estrela, pontiaguda, enrugada e distorcida. A mudança fenotípica é uma parte muito importante da adaptabilidade do patógeno para a mudança de ambiente durante a invasão do organismo humano, tendo a capacidade de infectar muitos tecidos fundamental importância para o sucesso do ataque e disseminação dentro do hospedeiro (SANTANA, *et al.*, 2013).

Dois grandes grupos dividem as toxinas produzidas por este fungo, algumas são toxinas de alto peso molecular (glicoproteína - Canditoxina) e outras toxinas de baixo peso molecular (até agora seis tipos diferentes foram isolados). Ambos apresentaram efeitos tóxicos, influenciando os mecanismos de defesa do hospedeiro (MAGDALENA; PERRONE, 2001).

3.2.2 Identificação e diagnóstico

A adequada escolha do tratamento antifúngico depende da identificação precisa das variadas espécies do gênero *Candida*, tendo em vista que leveduras deste gênero são os principais responsáveis por infecções sistêmicas potencialmente fatais em pacientes neutropênicos tratados para câncer ou distúrbios linfoproliferativos, hospedeiros imunocomprometidos, particularmente pacientes infectados por vírus da imunodeficiência humana (HIV), e em transplante de órgãos. É também considerada uma das infecções hospitalares mais comuns, principalmente em pacientes internados (catéteres e hemocultura). O diagnóstico precoce e preciso pode reduzir elevada taxa de mortalidade, reduzindo também o tempo de internação destes pacientes. (SANTOS; SOARES, 2005; FERREIRA *et al.*, 2013).

O diagnóstico de candidíase é fundamentado em dados da anamnese, como também nos sinais presentes no exame físico. Várias técnicas são utilizadas para coleta de material clínico para investigação da *Candida* nos tecidos, como: esfregaço, cultura e biópsia da mucosa. A escolha da técnica deve ser direcionada pelo tipo de lesão a ser investigada.

No exame direto, nos casos de infecção, são observadas hifas e pseudo-hifas. A biópsia é o método mais indicado para confirmar o diagnóstico em alguns casos de candidíase atípica ou resistente ao tratamento. A citopatologia consiste na utilização de uma espátula de metal ou microescova, para a coleta de células epiteliais obtenção de material através da raspagem da área a ser investigada. O esfregaço tem como vantagem o baixo custo, fácil execução, resultado rápido, ser minimamente invasiva e indolor, importante para o paciente debilitado. Essa técnica é realizado após a coleta, em lâmina de vidro, fixação em álcool e, posteriormente, coloração de Papanicolaou ou PAS (ácido periódico de Schiff) para avaliação em microscópico. (SIQUEIRA, *et al.*, 2014).

O melhor método para a prevenção do câncer de colo uterino é o exame de Papanicolaou ou exame citopatológico, mas não é o mais eficaz para detectar os principais

agentes infecciosos causadores de vulvovaginites. Na coloração de Papanicolaou é possível observar os agentes pela sua morfologia e pela característica do esfregaço. Sobretudo como teste mais sensível para tal finalidade destaca-se o método microbiológico (RAUGUST, 2013).

Nesse método as colônias das espécies de *Candida* cultivadas em àgar Sabouraud apresentam características variadas, podendo ser de coloração branca ou creme, lisas ou enrugadas, brilhantes e úmidas. Microscopicamente podem se apresentar morfológicamente na forma de blatoconídios (leveduras), hifas ou pseudohifas (SILVA *et al.*, 2012).

Considerado padrão-ouro em casos de candidemia, a hemocultura, tem baixa sensibilidade e a elevada taxa de resultados falso-negativos já foi demonstrada pela detecção da infecção fúngica em menos de 50% dos pacientes com infecção por *Candida* spp. Além disso, o diagnóstico por hemocultura pode demorar três a cinco dias em sistemas automatizados, tempo relativamente longo para começar a terapia antifúngica. A escolha do antifúngico é influenciada pela variabilidade intrínseca existente entre as diferentes espécies de *Candida*, evidenciando assim, a necessidade de um diagnóstico preciso e confiável (LUTZ *et al.*, 2013).

A técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em ensaios de diagnóstico de *Candida* por detecção do DNA fúngico vem sendo apontada e descrita como nova metodologia proposta, devido a atrasos na identificação convencional e limitações para diferenciar espécies (LUTZ *et al.*, 2013).

3.2.3 Resistência microbiológica

A resistência microbiológica pode ser classificada como resistência primária (intrínseca) e resistência secundária (adquirida). A resistência microbiológica primária é a resistência natural entre certas espécies de fungos sem exposição prévia ao medicamento antifúngico. Temos como exemplo de resistência primária a resistência ao fluconazol em *C. kruseiisolates*. A resistência secundária se desenvolve em espécies de fungos intrinsecamente suscetíveis após exposição ao fármaco antifúngico Como por exemplo de resistência secundária, o desenvolvimento da resistência ao fluconazol em *C. albicansis*. A resistência secundária enfatiza a importância do teste de susceptibilidade antifúngica ao

isolado de fungos a partir de espécimes clínicos (DEORUKHKAR; ROUSHANI; RAYTEKAR, 2017).

A resistência microbiológica pode ser objetivamente definida, mediada e investigada cientificamente (SANGLARD; ODDS, 2002). Já a resistência clínica contrasta com a microbiológica, sendo definida como uma condição em que há falha na erradicação da infecção fúngica apesar da administração de agente antifúngico (KANAFANI; PERFECT, 2008). Esta resistência ocorre devido a fatores de variedade relacionados ao hospedeiro, ao fármaco antifúngico ou às espécies fúngicas infectantes. Algumas propriedades estão associadas à falha do tratamento de agentes antifúngicos como resistência a um agente antifúngico, tipo de célula e tamanho das populações de fungos. Os fatores de acolhimento responsáveis pela resistência clínica incluem o estado imune do paciente, a presença de materiais estranhos, incluindo dispositivos médicos, local de infecção e abscessos não drenados, enquanto que a dosagem apropriada, a natureza fungistática do agente antifúngico, a fraca absorção, distribuição ou metabolismo e a interação droga-droga.(CANUTO; RODERO, 2002).

3.2.4 Tratamento

As duas drogas mais comumente utilizadas para o tratamento de infecções invasivas por *Candida* são, a anfotericina B (polienos) e fluconazol (derivado azólico (FERREIRA; RAGAZZINI; ANDRADE, 2012).

A ação dos fármacos azólicos ocorre na membrana celular fúngica, através da inibição da enzima lanosterol 14- α -desmetilase, dependente do citocromo P – 450, ocorrendo consequentemente a inibição da biossíntese do ergosterol da membrana fúngica. Dessa forma, além de depleção nos níveis de ergosterol inibindo o crescimento das células, ocorre um acúmulo de esteróis metilados que são tóxicos para o microorganismo. (SANGLARD *et al.*, 2016).

A anfotericina B (AmB) é um antimicrobiano da classe dos polienos, caracterizado por uma baixa solubilidade. A AmB é, via de regra, administrada por via intravenosa, misturada com um agente solubilizante como o deoxicolato de sódio, formulação mais utilizada na prática clínica para o tratamento de infecções fúngicas. O mecanismo de ação da AmB pode ser dividido entre efeitos diretos sobre a membrana, baseado na interação com o ergosterol celular, causando a formação de poros na membrana que resultam em

perda de sua integridade e rápido extravasamento de íons, ocasionando a morte celular; e efeitos intracelulares de indução de estresse oxidativo e aumento da formação de radicais livres evidenciado pela expressão dos genes de estresse celular, por mecanismos ainda não completamente conhecidos (FALCI.; PASQUALOTTO, 2015).

3.3 Tratamento com fitoterápicos

O homem se utiliza plantas com fins medicinais, para tratamento ou prevenção de doenças, desde a antiguidade. Nos anos 90, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (MARQUES *et al.*, 2016).

Detentor da maior diversidade genética do mundo de plantas, com cerca de 55 mil espécies catalogadas (de um total estimado entre 350 a 550 mil), o Brasil conta com ampla tradição do uso das plantas medicinais vinculada ao conhecimento popular transmitido entre gerações. Entretanto, apesar da riqueza da flora brasileira, nos últimos 20 anos, o número de informações sobre plantas medicinais tem crescido apenas 8% anualmente. A grande maioria das plantas, normalmente empregadas como fitoterápicos populares, não tiveram suas potencialidades terapêuticas efetivamente comprovadas (CARNEIRO *et al.*, 2014).

A diferenciação entre os termos plantas medicinal, fitoterápica e fitoterapia se torna importante. A ANVISA propõe que plantas medicinais, tradicionais no uso como remédio em uma população ou comunidade, são aquelas capazes de aliviar ou curar enfermidades. Para sua utilização se faz necessário conhecer a planta e saber onde colhê-la e como prepará-la. Em sua industrialização para se obter um medicamento, tem-se como resultado o fitoterápico. Já a terapêutica que utiliza os medicamentos, cujos constituintes ativos são plantas ou derivados vegetais, leva o nome de fitoterapia, onde sua origem dá-se no conhecimento e no uso popular (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

As plantas medicinais exibem vários benefícios através da ação aditiva e/ou sinérgica dos numerosos componentes ativos, que atuam em múltiplos alvos associados com o processo fisiológicos, ao contrário dos fármacos sintéticos que são baseados em um único produto químico (MARQUES *et al.*, 2016).

Muitas comunidades e grupos étnicos têm o conhecimento sobre plantas medicinais como o único recurso terapêutico, tendo sua comercialização em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais. Após serem classificadas como produtos naturais, a lei permite que as plantas naturais sejam comercializadas livremente, além de poderem ser cultivadas por aqueles que disponham de condições básicas necessárias ao plantio. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 80% da população mundial utilizou algum tipo de erva na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável, onde pelo menos 30% deu-se por indicação médica. Essa prática popular já é vista pela OMS como forma de baixar os custos dos programas de saúde pública (SILVA et al., 2012).

3.4 Aspectos gerais do hibiscus

A vinagreira destaca-se como uma das hortaliças de uso expressivo, tanto do ponto de vista alimentar como fonte de renda para numerosas famílias que dela tiram seu sustento. A mesma pertence à família das Malváceas, do gênero Hibisco, que compreende cerca de 200 espécies de plantas. Concretamente, sabe-se que sua distribuição abrange os Continentes Africanos, Asiático, Europeu e Americano. No Brasil, a vinagreira foi introduzida provavelmente por meio do tráfico de escravos. É conhecida popularmente como Hibisco, Hibiscus, roselia, groselha, azedinha, quiabo azedo, caruru-azedo, caruru-da-guiné e quiabo-de-angola (FREITAS; SANTOS; MOREIRA, 2013).

Trata-se de uma planta adaptada ao clima quente, que se desenvolve bem em temperatura superior a 21°C e 35°C, cultivada em uma ampla faixa de condições ambientais. Com isso, torna-se mais adequado para seu cultivo, as regiões quentes e com precipitações anuais entre 800 mm e 1600 mm bem distribuídas, sendo prejudicado por épocas frias e secas (FREITAS; SANTOS; MOREIRA, 2013).

O hibisco pode atingir mais de 1,80 m de altura, possui poucas ramificações em forma de taça de tonalidade vermelha. Arbusto de ciclo anual, seu cultivo ideal é feito em regiões tropicais e subtropicais. A corola é composta por cinco sépalas de intensa coloração vermelha em forma de cone, que forma o cálice, a flor é simples, séssil e axilar. Na base do cálice, está o cálculo, pequeno cálice arranjado em círculo. Abrigando as sementes está a cápsula deiscente, fruto que possui aspecto aveludado e cerca de 2 cm de comprimento (MACIEL et al., 2012).

Segundo Lorenzi *et al* , os dados botânicos do *Hibiscus rosa-sinensis* L., conhecidos popularmente como mimo-de-vênus ou hibisco-da-china, são de arbusto pouco ramificado ou simples e lenhoso da Ásia Tropical, que chega a medir cerca de 3 a 5 metros de altura e com grande número de variedades e formas cultivadas. Possuem caule redondo quase aveludado, com pêlos glandulosos; suas folhas são lobadas, pecioladas, alternas, densamente pilosas ao longo das nervuras, com granulações estreladas na face superior; as estípulas são pubescentes e agudas; e os pedúnculos são arqueados, arredondados, pubescente-aveludados. As flores são grandes e solitárias, normalmente brancas de manhã e rosas ou vermelhas à tarde, formadas em quase todo o ano; possuem cílios nas margens das pétalas, com fruto com cinco lóculos do tipo capsular; e a cápsula é aveludada, com pêlos glandulíferos e estrelados.

Estudos comprovam a utilização do hibisco como agente diurético, uricosúrico, leve laxante, antimicrobiano, sedativo, anti-hipertensor, antitússico, como também na diminuição dos níveis de lipídios totais, colesterol e triglicérides, no tratamento gastrointestinal, pedra nos rins, danos no fígado e efeitos da embriaguez. Estudos recentes apontam sua ação antioxidante, antimutagênico, antitumoral e antileucêmico (VIZZOITO; PEREIRA, 2008).

3.5 *Mimosa tenuiflora*

Planta típica das áreas semi-áridas do Brasil, a *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir. (jurema-preta, trata-se de uma leguminosa da subfamília Mimosoideae e popularmente utilizada para fins terapêuticos, por tribos indígenas e pelas populações dessas regiões em países da América Latina. Estudos demonstram seu potencial, analgésico, antimicrobiano, regenerador de células, antitérmico e adstringente peitoral (PEREIRA et al., 2008).

A jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*) apresenta crescimento rápido, tem seu cultivo comum em áreas antropizadas da Caatinga e são amplamente utilizadas para a produção de lenha, carvão vegetal e madeira para confecção de cercados (LIMA et al., 2014).

Hoje em dia a queima da madeira e da casca da jurema-preta vem sendo explorada para produção de energia. Vale ressaltar que seu tronco pode ser utilizada para finalidade energética, entretanto, a casca poderia ser empregada para a extração de taninos, procurando realizar a utilização total dos produtos florestais para reduzir ao máximo a geração de resíduos, visando a sustentabilidade, agregando produtos associados de uso

direto e/ou indireto. Desta forma, surgem novas alternativas tecnológicas com o emprego da madeira na geração de energia ecoeficiente, a casca para extração de taninos vegetais, dentre outras, possibilitando suprir as necessidades de pequenos empreendimentos, proprietários rurais e, principalmente, das comunidades existentes na região Nordeste do Brasil. (LOPES, et al., 2015)

3.6 *Anacardium occidentale*

A planta *Anacardium occidentale*, conhecida popularmente como cajueiro L. pertence à família Anacardiaceae. Natural do Brasil, é utilizada na medicina tradicional, principalmente no nordeste brasileiro. Tem sua atividade farmacológica comprovada pela literatura, como sendo o cajueiro uma planta antidiabética; antiinflamatória; inibidor da enzima acetilcolinesterase e antimicrobiana. O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma planta tropical, dispersa em quase todo o território nacional. (PEREIRA *et al.*, 2015).

O seu fruto é composto pelo pedúnculo floral ou pseudofruto, que representando cerca de 90% do peso total, que representa a parte comestível in natura do caju, o qual é utilizado na preparação de sucos, mel, doces, passas, sorvetes e licores. Os 10% restantes são o fruto propriamente dito, a castanha, de onde se extraem a amêndoa da castanha de caju (ACC), o líquido da castanha de caju (LCC), matéria-prima básica para a fabricação de vernizes, tintas, plásticos, lubrificantes e inseticidas; e o tanino, que é obtido da película da amêndoa e apresenta grande aplicação na indústria química (BARRETO *et al.*, 2014).

O cajueiro está associado a muitos usos etnofarmacológicos. Podemos destacar seu efeito adstringente, antidiabético, antidiarréico, anti-hemorrágico, antiinflamatório, antireumático, antitérmico, antiulcerogênico, diurético e vermífugo, onde são utilizados cascas do caule, casca da castanha, ramos, pedúnculos, raiz, folhas, frutos, semente e óleo (GONÇALVES *et al.*, 2005). Além da atividade antioxidante, através da ação de metabólitos especiais (ácidos anacárdicos, cardanóis, cardóis e fenóis alquílicos) extraídos do líquido da castanha de caju (TREVISAN *et al.*, 2006).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo trata-se de uma pesquisa experimental com abordagem quali-quantitativa, relacionada ao potencial antifúngico dos extratos de *Anacardium occidentale*, *Mimosa tenuiflora* e do *Hibiscus rosa-sinensis* frente a leveduras patogênicas do gênero *Candida*.

Realizado no Centro Vocacional Tecnológico (CVT), laboratório vinculado ao Centro de Ciência e Tecnologia Agroalimentar (CCTA) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), localizado na Rua Jairo Vieira Feitosa, 1770 – Pedreiros, Pombal – PB, Brasil.

4.1 Cepas fungicas

As cepas utilizadas, *C. albicans* 40178 ATCC 60193, *C. parapsilosis* 40305 ATCC 96144, *C. tropicalis* 40042 ATCC 13803, *C. fumata* 40135 ATCC 62894, *C. metapsilosis* 40329 ATCC 66143 e *C. orthopsilosis* 40329 ATCC 96139, foram obtidas mediante doação do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), onde as mesmas fazem parte da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária.

As amostras foram transportadas em embalagem apropriada até o CVT/UFCG, onde foram preparadas para o processo de reidratação, em condições assépticas. A parte superior da ampola foi aquecida pela chama do bico de bunsen e resfriada com algumas gotas de solução salina (NaCl 0,85g/L) após serem desinfetadas com álcool etílico a 70% (Start), promovendo a quebra do vidro por choque térmico. Posteriormente, com o auxílio de uma micropipeta, ocorreu a homogeneização de 500ml de água deionizada ressuspensos com o sedimento.

Na superfície do meio das placas de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose acrescido de cloranfenicol (50mg/L), foi realizado o semeio, por esgotamento, da suspensão formada, com auxílio de uma alça de Drigasky, e incubado a 35°C em estufa de cultivo por 72 horas. Para identificação da morfologia das espécies após o surgimento das colônias, foram realizadas as análises por exame direto com clarificador hidróxido de potássio. Após a identificação as espécies foram mantidas à temperatura de 35° C.

4.2 Espécies vegetais

Todas as amostras das espécies foram coletas no interior do sertão paraibano. A coleta das flores de hibisco procederam na zona urbana na cidade de cajazeiras enquanto as cascas da jurema-preta e do cajueiro advieram da zona rural da cidade de Pombal.

4.3 Obtenção do extrato hidroalcoólico de *Anacardium occidentale* e *Mimosa tenuiflora*

Realizou-se a remoção manual das cascas dos troncos, de cada indivíduo arbóreo, com auxílio de facões e martelos. Posteriormente, a secagem natural do material vegetal foi alcançado em ambiente ventilado durante quatro dias. As cascas provenientes de cada arvore foram fragmentadas em moinho de grãos e seguidamente 50g do pó resultante foi pesado em uma balança de precisão sendo seguidamente misturado com 80 ml solução hidro-alcoólica (etanol 70%).

As soluções obtidas permaneceram estocada à temperatura de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$, protegida da luz, por um período de 15 dias, em seguida a filtragem do material foi realizada em papel filtro previamente esterelizado. Por fim, o produto foi vaporizado no Rotaevapor Fisatom 801 a 50°C , até a completa vaporização e obtenção do extrato bruto. Para as análises os extratos foram dissolvidos em água destilada esterelizada.

4.4 Obtenção do extrato hidroalcoólico do *Hibiscus rosa sinensis*

Realizou-se maceração em etanol 70% com as flores de Hibiscus, com proporção 1:5, durante 15 dias, após a mistura em agitador automático por 120 min foi filtrada, e o solvente eliminado em rotaevaporador a 50°C . O extrato seguiu sendo diluído em água destilada estéril para a verificação do potencial antimicrobiano.

4.5 Testes de susceptibilidade antifúngica

Os testes de sensibilidade antifúngica, foram realizados através da técnica de teste de difusão em disco, correspondendo as seguintes substâncias avaliadas: fluconazol

(controle positivo), etanol 70% (controle negativo) e os extratos hidroalcoólicos das plantas em concentrações de 100, 50, 25, 12,5%.

As cepas foram consideradas sensíveis quando as titulações para os extratos testados atingiram valores superiores a 50% do valor total do controle positivo de inibição. Realizou-se a leitura com 24 e 48 horas. Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado expresso pela média aritmética das medidas dos halos formados.

4.5.1 Teste de difusão em disco

A CIM das leveduras frente às substâncias avaliadas foi realizado de acordo com o protocolo M44-A2, (CLSI, 2009) e sendo determinada pela técnica de difusão em disco, que foi realizada no laboratório de microbiologia do CVT/UFCG. Foi utilizado como meio de cultura o ágar Mueller-Hinton suplementado com 2% de glicose e 0,5ul/ml de azul de metileno com pH 7,2 a 7,4. Os discos confeccionados em papel de filtro medindo 6 mm de diâmetro.

As *Candida* spp. isoladas seguiram sendo mantidas em meio SDA e incubadas a 37°C por 24h. As suspensões dos isolados resultaram de preparadas em solução salina (0,85g/L), com sua densidade ajustada de acordo com a escala 0.5 de MacFarland em 90% da transmitância obtida através de um espectrofotômetro a 530nm, garantindo a concentração do inóculo entre 1×10^6 a 5×10^6 células por mL.

Seguidamente com o auxílio de um swab mergulhado nesta solução foi realizado o semeio pela técnica de esgotamento cobrindo todo o meio contido na placa (ágar Mueller-Hinton suplementado com 2% de glicose e 0,5ul/ml de azul de metileno). Após este processo, decorridos 15 minutos, foram distribuídos na placa os discos impregnados com as substâncias a serem testadas com o auxílio de uma pinça estéril, em seguida susederam sendo armazenadas em geladeira por um período de 15 minutos promovendo assim o início da difusão dos extratos hidroalcoólicos no meio, seguidamente foram incubados em estufa microbiológica a 35°C por 48 horas para determinação da CIM.

Como sendo o disco contendo o antifúngico fluconazol utilizado como controle positivo e como controle negativo foi utilizado um disco impregnado de álcool 70%.

Efetuuou-se a leitura com 24 e 48 horas para a ambas as substâncias, o tamanho do halo de inibição medido com paquímetro e correlacionado com a escala de sensibilidade para fluconazol presente no documento M44-A2 (2009, CLSI), onde se o halo apresentar

tamanho $\geq 19\text{mm}$, a cepa é sensível (S), se apresentar entre 15-18mm é dose dependente (SDD) e $\leq 14\text{mm}$ é resistente (R). Não existe uma escala de sensibilidade para produtos naturais, portanto, foi considerado uma escala de até 50% em referência ao fluconazol, onde o extrato hidroalcoólico das plantas que promoveram a formação de um halo $\geq 9\text{mm}$, a cepa foi considerada sensível, quando se apresentau entre 7-8mm, dose dependente e $\leq 7\text{mm}$, resistente.

Como critérios de interpretação da determinação da sensibilidade ao fluconazol para os isolados de *Candida spp* pela técnica de difusão em disco, foram utilizados os dados extraídos do Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2019), considerando sensíveis as cepas que apresentaram halo $\geq 19\text{ mm}$, sensível dose dependente entre 15mm e 18mm e resistente $\leq 14\text{mm}$. Enquanto a determinação da atividade antifúngica dos extratos avaliados para isolamento de *candida spp* foi estabelecida como sensível para halos $\geq 10\text{mm}$, sensível dose dependente entre 8mm e 9mm e resistente $\leq 7\text{mm}$ (PORTILHO et al., 2013). Realizados em duplicata, os resultados dos testes obtidos foram expressos em mm, calculados pela média aritmética do diâmetro dos halos de inibição formados ao redor dos discos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Determinação da atividade antifúngica dos extratos hidroalcoólicos.

Os resultados da determinação da atividade antifúngica *in vitro* para a determinação da Concentração Inibitória Mínima em meio sólido em termo de diâmetro dos halos de inibição dos extratos hidroalcoólicos das cascas de *Anacardium occidentale* e *Mimosa tenuiflora* assim como fluconazol sobre as cepas de *C. albicans* 40178 ATCC 60193, *C. parapsilosis* 40305 ATCC 96144, *C. tropicalis* 40042 ATCC 13803, *C. fumata* 40135 ATCC 62894, *C. metapsilosis* 40329 ATCC 66143 e *C. orthopsilosis* 40329 ATCC 96139 estão apresentadas nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 - Registro dos tamanhos de halos formados pelas espécies ensaiadas de acordo com as concentrações inibitórias mínimas frente ao extrato hidroalcoólico de *Anacardium occidentale* e ao fluconazol

Espécies	CIMs (mg/mL)				
	Extrato hidroalcoólico de <i>Anacardium occidentale</i>				Fluconazol
	100mg/mL	50mg/mL	25mg/mL	12,5mg/mL	25mg/mL
Ct	18 mm	10 mm	8,4 mm	6,4 mm	20 mm
Cf	19 mm	14 mm	11 mm	8,4 mm	23 mm
Ca	18 mm	13 mm	10 mm	10 mm	20 mm
Co	14 mm	11 mm	9 mm	8 mm	24 mm
Cp	14 mm	11 mm	10 mm	7 mm	21mm
Cm	14 mm	12 mm	8 mm	6 mm	21 mm

Fonte: Elaborado pela autora com dados extraídos dos resultados da pesquisa (2018).

Ct: *C. tropicalis* INCQS 40042; Cf: *C. fumata* INCQS 4013; Cl; Ca: *C. albicans* INCQS 40178; Co: *C. orthopsilosis* INCQS 40304; Cp: *C. parapsilosis* INCQS 40305; Cm: *C. metapsilosis* INCQS 40329.

Tabela 2 - Registro dos tamanhos de halos formados pelas espécies ensaiadas de acordo com as concentrações inibitórias mínimas frente ao extrato hidroalcoólico de e *Mimosa tenuiflora* ao fluconazol

Espécies	CIMs (mg/mL)				
	Extrato hidroalcoólico de <i>Mimosa tenuiflora</i>				Fluconazol
	100mg/mL	50mg/mL	25mg/mL	12,5mg/mL	25mg/mL
Ct	12 mm	9,4 mm	5 mm	6 mm	22 mm
Cf	16 mm	13 mm	11 mm	10 mm	20 mm
Ca	16 mm	12 mm	11 mm	6,8 mm	24 mm
Co	9,8 mm	6,8 mm	6 mm	6 mm	20 mm
Cp	12,8 mm	10 mm	6,4 mm	6,4 mm	21 mm
Cm	12 mm	9,1 mm	6,2 mm	6,2 mm	21 mm

Fonte: Elaborado pela autora com dados extraídos dos resultados da pesquisa (2018).

Ct: C. tropicalis INCQS 40042; *Cf: C. fumata* INCQS 4013; *Cl: C. albicans* INCQS 40178; *Co: C. orthopsilosis* INCQS 40304; *Cp: C. parapsilosis* INCQS 40305; *Cm: C. metapsilosis* INCQS 40329.

Quanto ao extrato hidroalcoólico das flores de *Hibiscus rosa-sinensis* utilizado nesse estudo não apresentou eficácia na inibição do crescimento *in vitro* das cepas testadas. O etanol 70% utilizado como controle negativo, não apresentaram formação de halo de inibição em nenhum das amostras testadas, evidenciando sua utilização para extração de compostos secundários de produtos naturais, pois não interfere na detecção de sua atividade antimicrobiana.

Com relação a sensibilidade do fluconazol em disco com concentração de 25 mg/mL, 100% dos seis isolados clínicos testados, apresentaram tamanho de halo compatível com sensibilidade.

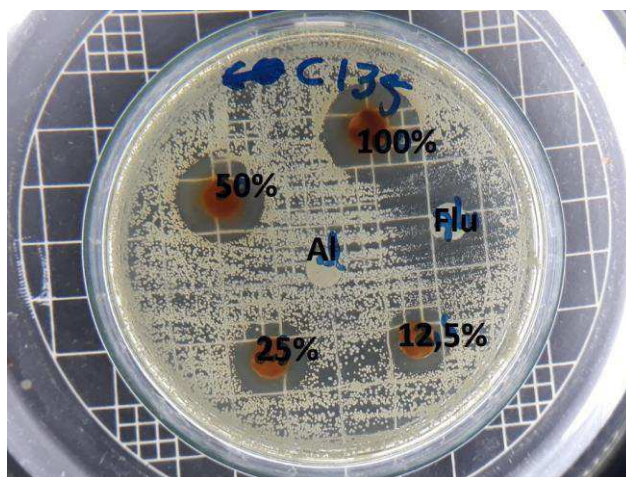
No experimento utilizando, o extrato da casca de *Anacardium occidentale* foi observado atividade antifúngica em todas as diluições (Tabela 1).

Os testes realizados com extrato bruto e na concentração de 50% apresentou sensibilidade contra todas as espécies de candida testadas, com tamanho de diâmetro dos halos superiores a 10mm. Enquanto na concentração de 25% apenas *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. famata* apresentaram sensibilidade enquanto *C. orthopsilosis*, *C. tropicalis*, *C. metapsilosis* se mostraram dose dependente. Em menores concentrações

(12,5%) apenas a *C. albicans* demonstrou sensibilidade, as candidas *C. famata* e *C. orthopsilosis*, dose dependentes enquanto *C. tropicalis*, *C. metapsilosis* e *C. parapsilosis*.

O extrato de *Anacardium occidentale* apresentou atividade antifúngica mais efetiva do que o fluconazol frente a cepa de *C. famata*, visto que o halo formado pelo antifúngico convencional foi observado o crescimento de colônias resistentes, diferentemente do efeito do extrato que inibiu o crescimento total no halo formado (**figura 1**).

Figura 1 – Desenvolvimento de halo de 19 mm da espécie de *Candida famata* frente ao extrato de *Anacardium occidentale* (100%).



Fonte: Própria autora (2018).

Al: Álcool 70%; Flu: Fluconazol (25 mg/mL); 100%, 50%, 25%, 12,5%: diluições do extrato testado.

Em sua pesquisa Corrêa 2017, utilizou a técnica de microdiluição em placa de polipropileno, segundo os critérios usado, considerou a atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* como moderado e inativo para *C. albicans*, diferindo dos critérios e resultados obtidos por esta pesquisa, visto que o extrato foi considerado efetivo nas concentrações de 50% como também para o extrato absoluto (100%). O que pode ser justificado considerando que os medicamentos a base de plantas medicinais podem sofrer alterações em sua qualidade por alguns fatores como a estação do ano, tempo da colheita, locais de cultivo, processamento pós colheita, procedimentos de extração e preparação (BANOMINI, 2013). Apesar de ambas as pesquisas deterem o mesmo agente extrator (etanol 70%), os métodos se diferem quanto a obtenção do material vegetal utilizado, o tempo do processo de maceração, como também a concentração obtida pelo peso da casca sobre o volume do agente extrator em litros, visto que Corrêa obteve o material vegetal em

um mercado em Belém no estado do Pará, manteve as cascas sob maceração por apenas 72 horas em uma concentração de 20g/L enquanto este estudo obteve o material vegetal por meio da extração física da planta cultivada na cidade de Pombal no interior da Paraíba, região essa que se apresenta com clima tropical, a maceração perdurou por 15 dias em uma concentração de 625g/L.

São escassos trabalhos na literatura, que demonstram a atividade antifúngica do *Anacardium occidentale* frente a espécie *Candida ssp* através da técnica de difusão em meio sólido. Todavia foram publicados outros estudos com diferentes espécies vegetais, utilizando essa técnica. No estudo de Cavalcanti (2012) foi demonstrado através da técnica de difusão em Ágar, que os extratos vegetais avaliados, representados pelos óleos essenciais de *Citrus aurantium* (laranja), *Citrus limmom* (limão siciliano), *Citrus reticulata* (tangerina), *Xylopia brasiliensis* (pindaíba), *Campomanesia xanthocarpa* (guabiroba), *Ocimum basilicum* (manjerição) e *Cymbopogon martinii* (palmarosa) apresentaram atividade antifúngica, sobre as cepas de *Candida abicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*.

Observa-se na tabela 2 que o extrato obtido da casca de *Mimosa tenuiflora* também apresentou atividade antifúngica sendo que os melhores resultados foram observados sobre *C. famata*, demonstrado sencível a todas as concentrações testadas do extrato. Na concentração de 12,5% houve uma resistência de todas as outras cepas testadas, enquanto na concentração de 25% além da *C. famata* a *C. albicans* também se mostrou sencível. Sendo a *C. orthopsilosis* a única a não apresentar sencibilidade em nenhuma das titulações sendo resistente até a concentração de 50% e dose dependente ao extrato bruto. Pereira *et al.* (2009), observou que o extrato da casca da jurema-preta apresentou formação de variados tamanhos de halo de inibição de crescimento, igual e superior a 10 mm de diâmetro, considerando o extrato com atividade antifúngica bastante satisfatória sobre amostras de *Candida spp.*

Comparando com resultados obtidos por Lozoya *et al.*, 1989 e Lozoya *et al.*, 1990, Pereira *et al* (2009) concluiu compatibilidade com os dados observados no seu experimento. Segundo os critérios usados nas pesquisas, é possível confirmar os resultados aqui encontrados, mesmo apresentando diferenças metodológicas, incluindo a obtenção do extrato.

Em uma pesquisa realizada por Macêdo-Costa *et al.* (2009), verificou-se a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *Mimosa tenuiflora* sobre as linhagens de *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus*

e *Lactobacillus casei*, demonstrando uma significativa atividade antibacteriana in vitro sobre as linhagens. Demonstrando assim que sua atividade engloba grupos bacterianos não sendo restrita ao grupo fungico.

A atividade antimicrobina do extrato de *M. tenuiflora*, pode estar relacionadas ao teor de fenóis totais, como taninos e flavonóides (MACEDO, *et al.*, 2009; PEREIRA, *et al.*, 2009).

Figura 2 – Determinação de resistência por falta de desenvolvimento de halo das espécies de *Candida* testadas frente ao extrato de *Hibiscus rosa-sinense*.



Fonte: Própria autora (2018).

Observa-se na **figura 2**, no presente estudo, que o extrato de *Hibiscus rosa-sinense* não apresentou atividade antifúngica frente as cepas de *Candida*. Não foram identificados relatos na literatura de ensaios antifúngicos do *Hibiscus rosa-sinenses* frente ao gênero *candida spp.*

6 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que o extrato hidroalcoólico da casca de jurema preta apresenta atividade antifúngica em todas as linhagens ensaiadas, sendo mais efetivo frente a cepa de *C. famata*, contra qual apresentou sensibilidade na mínima concentração testada (25%).

O extrato da casca do cajueiro também apresentou resultado antifúngico nesse estudo, mostrando-se eficaz frente as espécies de *Candida* estudadas, com o menor valor de Concentração Inibitória Mínima contra *C. albican*. No entanto o extrato das flores de hibisco não demonstraram ação antifúngica nas concentrações testadas.

Faz-se necessário o aprofundamento dessas e de outras pesquisas com base nas plantas medicinais com possíveis resultados de novos antifúngicos, como meios alternativos de baixo custo, com menos efeitos adversos ao organismo e mais acessíveis a população.

O comportamento dos extratos in vivo podem não corresponder aos resultados obtidos in vitro devido a suas limitações nos estudos, uma vez que não estão expostas às mesmas condições no organismo. Recomenda-se a realização de outros testes microbiológicos e ensaios clínicos para a verificação da viabilidade de seu uso.

REFERÊNCIAS

- AIKAWAA, N. E.; ROSA, D. T. A.; NEGRO, G. M. B. D.; MORAES, J. C. B.; RIBEIRO, A. C. M.; SAAD, C. G.; SILVA, C. A.; BONFÁ, E. **Infecção sistêmica e localizada por *Candida* spp. em pacientes reumatológicos em terapia anti-TNF.** Revista Brasileira de Reumatologia. 2016;56(6):478–482.
- ALMEIDA, M. B. **Prospecção tecnológica de óleos essenciais de *Schinus terebinthifolius* e desenvolvimento de um creme vaginal à base de *Ocimum basilicum* para tratamento de candidíase.** 2013. 102f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2013.
- ALMEIDA, S. K. F.; QUEIROZ, K. B.; VANDESMET, L. C. S. **Imunopatogenese da *Candida albicans*: uma revisão bibliográfica.**
- ALVAREZ, I. A.; OLIVEIRA, U. R.; MATTOS, P. P.; BRAZ, E. M.; CANETTI, A. **Arborização urbana no semiárido: espécies potenciais da caatinga.** Embrapa Florestas, Colombo, 2012.
- BARBEDO, L. S.; SGARBI, D.B.G. **Candidíase.** DST - J bras Doenças Sex Transm 2010; 22(1): 22-38
- BARRETTO, L. C. O.; FREITAS, S. P.; MOREIRA, J. J. S.; SILVA, G. S.; BRITO, L. B. **Anacardium occidentale L.: prospecção tecnológica aplicada à tecnologia de compostos bioativos em produtos alimentícios.** Revista GEINTEC – ISSN: 2237-0722. São Cristóvão/SE – 2014. Vol. 4/n. 4/ p.1356-1366
- -BRASIL. Ministério da Saúde. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde.** Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 156 p. n. 31. 2012.
- BONASSOLI, L.A.;BERTOLI, M.; SVIDZINSKI, T.I. **High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts.** J Hosp Infect 59, 159-162. 2005.

- BANIMINNI, T. J. **Padronização de metodologia para extração do fitoconstituente majoritário das flores de Allamanda catártica L. (APOCYNACEAE)**. Dissertação submetida à Universidade do Vale do Itajaí como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas. 2013.
- CANUTO, M; RODERO, F. **Antifungal drug resistance to azoles and polyene**. *The Lancet Infect Dis*2:550-563. 2002.
- CAVALCANTI, Y. W.; PÉREZ. A. L. A. L.; XAVIER, G. D. R.; ALMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W. W. N. **Atividade Antifúngica de Extratos Vegetais Brasileiros sobre Cepas de *Candida***. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*. Volume 16 Número 1 Páginas 43-48 2012.
- CARNEIRO, F. M.; SILVA, M.J.P.; BORGES, L. L.; ALBERNAZ, L. C.; COSTA, J. D. P. **Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil**. *Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais – UEG/Câmpus de Iporá*, v.3, n. 2, p.44-75 – jul/dez 2014.
- CORRÊA, R. O. **Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de extratos vegetais frente aos principais microorganismos causadores da candidíase**. [Dissertação de Mestrado do curso de Pós Graduação em Saúde]. Juiz de fora-MG, 2017.
- DEORUKHKAR, S. C.; ROUSHANI. S., RAYTEKAR, N. A. **Antifungal resistance in candida species: an overview**. *Int. J. Drug Res. Tech.*2017, Vol. 7 (1), 26-34, 2017.
- ENDO, E. H, CORTEZ, D. A, UEDA-NAKAMURA, T; NAKAMURA, C. V; DIAS FILHO, B. P.. **Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans***. *Research in Microbiology*, v.161, n.7, p. 534-540, Sep. 2010.
- FALCI, D. R.; PASQUALOTTO, A. C. **Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade**. *Clin Biomed Res.*;35(2):65-82, 2015.
- FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. **Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica**. *Revista*

Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences
vol. 42, n. 3, jul./set., 2006.

- FERREIRA AV, PRADO CG, CARVALHO RR, DIAS KST, DIAS ALT. ***Candida albicans* and non-*C. albicans* species: comparison of biofilm production and metabolic activity in biofilms, and putative virulence properties of isolates from hospital environments and infections.** Mycopathologia. 2013;175(34):265–72

- FORNARI, G. HERKERT, P. F., REDIVO, D.D.B, BENEDETTI, V. P., GLIENKE, C. **Epidemiologia da colonização de leveduras *Candida* da cavidade bucal em pacientes diabéticos.** Rev. Saúde e Biol., v.8, n.2, p.1-6, mai./ago., 2013.

- GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. **Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia.** J. Bras. Patol. Med. Lab. vol.46 no.3 Rio de Janeiro June 2010.

- GONÇALVES, A. L.; ALVES-FILHO, A.; MENEZES, H. **Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas.** Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.72, n.3, p.353-358, jul./set., 2005

- GONÇALVES, J.L.S.; LOPES, R.C.; OLIVEIRA, D.B.; COSTA, S.S.; MIRANDA, M.M.F.S.; ROMANOS, M.T.V.; SANTOS, N.S.O.; WIGG, M.D. **In vitro anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea.** Journal of Ethnopharmacology, v.99, n.3, p.403-407, 2005.

- HARTMANN, A.; MISSIO, R.; HAMMAD, M. P.; ALVES, I. A. **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.
ISSN 2238-3360. Disponível em:
<<https://online.unisc.br/seer/index.php/epidemiologia/article/view/6556>>. Acesso em: 15 nov. 2017.

- HASSAN, F., XESS, I., WANG, X., JAIN, N. E FRIES, B.C. 2009. **Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence.** Microbes and Infection 11:753-761.

- JIANG, C.; DONG, D.; YU, B.; CAI, G.; WANG, X.; JI, Y.; PENG, Y. **Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis* in China.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Volume 68, p: 778 –785. December 2012.
- JÚNIOR, D.P.L.; MARTINS E.R.; HAHN, R.C.; YAMAMOTO, A.C.A.; TEIXEIRA, A. F. R. **Species of *Candida* isolated from anatomically distinct sites in military personnel in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil.** An Bras Dermatol. 2011;86(4):675–80.
- KANFANI, Z.; PERFECT, J. **Resistance to antifungal agents: Mechanisms and clinical impact.** Clin Infect Dis 46:120-128. 2008.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. The yeast. **A taxonomic study.** 4. ed. Amsterdam Elsevier, 1998.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINZ-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de micologia médica.** 9 ed. São Paulo: Savier, 2002.
- LIN D, W. L. C.; RINALDI, M. G.; LEHMANN, P. F. **Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources.** J Clin Microbiol. 1995 Jul;33(7):1815-21.
- LOPES, P. J. G.; CALEGARI, L.; CALEGARI, C. C. A.; OLIVEIRA, E.; STANGERLIN, D. M.; GATTO, D. A. **Produtividade em casca e taninos condensados de jurema-preta.** Nativa, Sinop, v. 03, n. 02, p. 95-101, abr./jun. 2015.
- LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; TORRES, M. A. V.; BACHER, L. B. **Árvores exóticas no Brasil: madeiras, ornamentais e aromáticas.** São Paulo: Instituto Plantarum; 2008.
- LUTZ, B.S.; SILVA, G. K.; CORBELINI, V. A.; RENNER, J. D. P.; POSSUELO, L. G.; VALIM, A. R. M. **Padronização das técnicas de pcr convencional e pcr**

em tempo real para diagnóstico de *Candida albicans*. Revista Jovens Pesquisadores, Santa Cruz do Sul, v. 3, n. 1, p. 51-66, 2013.

- MACÊDO-COSTA, M. R.; PEREIRA, M. S. V.; PEREIRA, L. F.; PEREIRA, A. V.; RODRIQUES, O. G. **Atividade Antimicrobiana e Antiaderente do Extrato da Mimosa tenuiflora (Willd). Poir. Sobre Microrganismos do Biofilme Dentário.** Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada, vol. 9, núm. 2, mayo-agosto, 2009, pp. 161-165.

- MAGDALENA, M. H.; PERRONE, M. **Factores determinantes de patogenicidad en relación a la ecología de *Candida albicans* en cavidad bucal.** Acta Odontol. Venez., Caracas, v. 39, n. 2, 2001.

- MARQUES, M. A. A.; LIMA, D. A.; ANDREOTTI, C. E.; GASPAROTTO JR, A.; LOURENÇO, E. L. B. **Caracterização das plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos para tratamento da osteoporose utilizados no Brasil.** Arq. Cienc. Saúde UNIPAR, Umuarama, v. 20, n. 3, p. 183-188, set./dez. 2016.

- MENEZES, H. E. A.; LIRA-FILHO, J. A.; MENEZES, H. E. A.; LIMA, F. S.; SILVA, L. L. **Espécies arbustivas selecionadas para o paisagismo no semiárido paraibano. Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais V.11 N.1 Jan./Abr. 2015.**

- MENEZES, T. O. A.; ALVES, A. C. B. A.; VIEIRA, J. M. S.; MENEZES, S. A. F.; ALVES, B. P.; MENDONÇA, L. C. V. **Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*.** Revista de Odontologia da UNESP. 2009; 38(3): 184-91.

- MINELLI, L.; NEME, L; PRADO, M. M. **Micoses superficiais.** RBM Revista Brasileira de Medicina. V 60 N 7 Jul 2003.

- MORSCHHÄUSER, J. 2010. **Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi.** Fungal Genetics and Biology 47:94–106.

- MUNOZ, P.; GIANNELLA, M.; FANCIULLI, C.; GUINÉ, J.; VALERIO, M.; ROJAS, L.; RODRÍGUEZ-CRÉIXEMS, M.; BOUZA, E. **Candida tropicalis fungaemia: incidence, risk factors and mortality in a general hospital.** *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 17 Number 10, P. 538–1545, October 2011.
- NETO, G. G.; MORAIS, R. G. **Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico.** *Acta Bot. Bras.* vol.17 no.4 São Paulo Oct./Dec. 2003.
- PEIXOTO, J.V.; ROCHA, M. G.; NASCIMENTO, R. T. L.; MOREIRA, V. V.; KASHIWABARA, T. G. B. **Candidíase - uma revisão de literatura.** *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR.* Vol.8,n.2,pp.75-82 (Jun-Ago 2014).
- PEREIRA1, A. V.; AZEVÊDO, T. K. B.; HIGINO, S. S. S.; SANTANA, G. M.; TREVISAN, L. F. A.; AZEVEDO, S. S.; PEREIRA, M.V.; PAULA, A. F. R. **Taninos da casca do Cajueiro: atividade antimicrobiana.** *Revista AGROTEC – v. 36, n. 1, p. 121-127, 2015.*
- PEREIRA, A. V.; RODRIGUES, O. G.; LOBO, K. M. S.; BEZERRA, D. A C.; MOTA, R. A.; COUTINHO, L. C. A.; SILVA, L. B. G.; ATHAYDE, A. C. R. **Atividade anti-fúngica do neem e jurema-preta sobre cepas de Candida spp isolados de vacas com mastite subclínica no Estado de Pernambuco.** *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy.* v.19, n.4, p. 818-822, Out./Dez. 2009.
- PIETRELLA, D., ANGIOLELLA, L., VAVALAZ, E., RACHINI, A., MONDELLO, F., RAGNO, R., BISTONI, F. E VECCHIARWLLI, A. **Beneficial effect of Mentha suaveolens essential oil in the treatment of vaginal candidiasis assessed by real-time monitoring of infection.** *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2011.
- PORTILHO, D. R.; MELO, I. A.; GUERRA, R. C.; BATISTA, H. L.; FERNANDES, C. H.C. **Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica da própolis produzida no estado do Tocantins.** *Revista Científica do ITPAC,* v. 6, n. 2, s.p., 2013.
- QUINDOS G. **Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face.** *Rev Iberoam Micol* 2014; 31(1).
- RAUGUST, T. M.; DUARTE, A.C.R. Aspectos clínicos, epidemiológico e diagnóstico citológico de Candida sp, Gardnerella vaginalis e Trichomonas vaginalis. São Paulo. 2012. V.1 N.1 P 1-13. Disponível em www.revistaseletronicas.fmu.br acessado em 14/11/2017.

- SAMARANAYAKE, D.P. E HANES, S.D. **Milestones in *Candida albicans* gene manipulation.** Fungal Genetics and Biology. 2011. 48:858-865.
- SANGLARD, D.; ODDS, F. “**Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences**”.The Lancet Infect Dis2:73-85. 2002.
- SANGLARD D. **Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens.** Front Medicine. 15;3:11, 2016.
- SANTANA, D. P.; RIBEIRO, E. L.; MENEZES, A. C. S.; E NAVES, P. L. F. **Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*.** Rev. Ciênc. Méd. Biol., Salvador, v.12, n.2, p.229-233, mai./ago. 2013.
- SANTOS ALS, SOARES RMA. *Candida guilliermondii* isolated from HIV infected human secretes a 50 kDa serine proteinase that cleaves a broad spectrum of proteinaceous substrates. FEMS Immunol Med Microbiol. 2005;43(1):13–20.
- SILVA, A. **Caracterização antibacteriana, química e fitoquímica de flores de *Hibiscus rosa-sinensis* L. (mimo de de vênus) e *Hibiscus silyriacus* L. (hibiscos – da – síria) como fonte de alimento.** [Dissertação de Mestrado do curso de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos]. Porto Alegre – RS, 2014.
- SILVA, S. M. F. Q.; PINHEIRO, S. M. B.; QUEIROZ, M.V.F.; PRANCHEVICIUS, M. C.; CASTRO, J.G. D.; PERIM, M. C.; CARREIRO, S. C. Atividade in vitro de extratos brutos de duas espécies vegetais do cerrado sobre leveduras do gênero *Candida*. Ciência & Saúde Coletiva, 17(6):1649-1656, 2012
- SILVA, S., NEGRI, M., HENRIQUES, M., OLIVEIRA, O., WILLIAMS, D.W., AZEVEDO, J. 2012. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS Microbiology reviews 36(2): 288-305.
- SIMÕES, R. J.; FONSECA, P.; FIGUEIRAL, M. H. **Infecções por *Candida* spp na Cavidade Oral.** Odontol. Clín.-Cient. (Online) vol.12 no.1 Recife Jan./Mar. 2013.

- SIQUEIRA, J. S. S.; BATISTA, S. A.; SILVA JR. A.; FERREIRA, M. F.; AGOSTINI, M.; TORRES, S. R. **Candidíase oral em pacientes internados em UTI.** Rev. Bras. Odontol. vol.71 no.2 Rio de Janeiro Jul./Dez. 2014.

- STRAMANDINOLI, R. T.; SOUZA, P. H. C.; WESTPHALEN, F. H.; BISINELLI, J. C.; IGNÁCIO, S. A.; YURGEL, L. S.; **Prevalência de candidose bucal em pacientes hospitalizados e avaliação dos fatores de risco.** Rev Sul-Bras Odontol. 2010 Mar;7(1):66-72.

- SUGITA, T., K. TAKEO, M. OHKUSU, E. VIRTUDAZO, M. TAKASHIMA, E. ASAKO, F. OHSHIMA, S. HARADA, C. YANAKA, A. NISHIKAWA, L. MAJOROS, AND M. SIPCZKI. **Fluconazole-resistant pathogens *Candida inconspicua* and *C. norvegensis*: DNA sequence diversity of the rRNA intergenic spacer region, antifungal drug susceptibility, and extracellular enzyme production.** Microbiol. Immunol. 2004, 48:761-766.

- TAVANTI, A.; DAVIDSON, A. D.; GOW, N. A.; MAIDEN, M. C.; ODDS, F. C. ***Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. To Replace *Candida parapsilosis* Groups II and III.** J Clin Microbiol. 2005 Jan;43(1):284-92.

- TREVISAN, M.T.S; PFUNDSTEIN, B.; HAUBNER, R.; WUERTELE, G.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H.; OWEN, R.W. **Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity.** Food and Chemical Toxicology, v.44, n.2, p.188-197, 2006.

- TROFA, D.;GACSER, A.; NOSANCHUK, J.D. ***Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen.** Clin Microbiol Rev 21, 606-625. 2008.

- VIDIGAL PG, SVIDZINSKI TIE. **Leveduras nos tratos urinário e respiratório: infecção fúngica ou não?** J Bras Patol Med Lab.2009 fev;45(1):55-64).

- VIZZOITO, M.; PEREIRA, M.C. **Hibisco: do uso ornamental ao medicinal.** Artigo em Hypertexto. 2008. Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/hibisco/index.htm acessado em 18 nov 2017.