

**GUILHERME RODRIGUES TEODORO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS  
DE *Buchenavia tomentosa* SOBRE *Candida* spp.**



**2011**

**GUILHERME RODRIGUES TEODORO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS  
DE *Buchenavia tomentosa* SOBRE *Candida* spp.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Microbiologia / Imunologia.

Orientadora: Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito  
Co-orientadora: Profa. Dra. Fernanda Lourenção Brighenti

São José dos Campos

2011

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:  
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para  
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos  
Campos: FOSJC/UNESP; 2010.

T264a Teodoro, Guilherme Rodrigues  
Avaliação da atividade antifúngica dos extratos de buchenavia tomentosa sobre  
candida spp / Guilherme Rodrigues Teodoro. - São José dos Campos : [s.n.],  
2011.  
90 .f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia bucal) – Faculdade de Odontologia de  
São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2011.  
Orientador: Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito.  
Co-orientador: Profa. Dra. Fernanda Lourenção Brighenti.

1. Candida. 2. Antifúngicos. 3. Terapias alternativas. 4. Fitoterapia. I. Koga Ito,  
Cristiane Yumi. II. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP -  
Univ Estadual Paulista. III. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita  
Filho”. IV. UNESP – Univ Estadual Paulista. V. Título

tD17

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da  
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

## AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,  
por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a  
fonte.

São José dos Campos, 8 de Setembro de 2011 .

Assinatura :

E-mail: guilhermerte@uol.com.br

## **BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito** (Orientadora)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP – Univ Estadual Paulista

**Profa. Adj. Mônica Fernandes Gomes**

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP – Univ Estadual Paulista

**Profa. Dra. Sônia Khouri**

Faculdade de Ciências da Saúde

UNIVAP – Univ do Vale do Paraíba

São José dos Campos, 26 de julho de 2011.

## Dedicatória

A **Deus**, que me deu inteligência, alegria, sabedoria, fé, esperança, perseverança, inspiração e tantas outras virtudes necessárias para ser um ser humano melhor e em paz, desenvolver este trabalho. E eu peço a ti Senhor, que a Ciência trabalhe em prol da humanidade!

Aos meus queridos pais, **Juscelino de Castro Teodoro** e **Rosa Maria Rodrigues Teodoro**, porque se hoje apresento essa dissertação é porque SEMPRE tive todo o seu apoio, carinho e fidelidade nos momentos bons e ruins de minha vida e com certeza, não existem palavras suficientes para lhes agradecer o que fizeram por mim.

Aos meus irmãos, **Juliana Rodrigues Teodoro** e **Ricardo Rodrigues Teodoro**, porque souberam me compreender e me ajudar, com palavras de incentivo e apoio nos dias em que eu estava cansado e desanimado tanto no desenvolvimento deste trabalho quanto na convivência do dia-a-dia.

## Agradecimentos

À minha querida orientadora Cristiane Yumi Koga Ito, primeiro por ter acreditado em mim e depois pela parceria, dedicação e fidelidade. Cris, você é um exemplo para mim! Muito obrigado!

À querida co-orientadora, Fernanda Lourenção Brighenti, uma jovem e brilhante cientista, mas acima de tudo uma pessoa admirável. Fê, muito obrigado!

Aos meus tão grandes amigos e companheiros de trabalho Daniel, Néia, Aline, Jorgiana e Bruno. Formamos um belo time galera, Obrigado!

À Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, incluindo seus professores e funcionários, que através do programa de pós-graduação em Biopatologia Bucal, abre portas para diversos profissionais que buscam melhorar.

À querida amiga e sempre professora Sônia Khouri, pelo incentivo, carinho, força nas horas difíceis e fornecimento de suas amostras para este estudo. Soninha, você é um exemplo de superação e vontade de vencer e foi com você que aprendi amar a Microbiologia! Muito obrigado!

À Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), onde junto com professores e funcionários administrativos trabalhei durante seis anos. Foi lá que dei meus primeiros passos no mundo científico e onde conquistei muitos amigos.

À CAPES, pela concessão da bolsa

Aos professores e funcionários do laboratório de Microbiologia da UNESP/FOSJC, onde desenvolvi meus experimentos

Aos sempre tão disponíveis alunos de iniciação científica Zulene, Pollyanna, Michelle, Raphael e principalmente as “minhas meninas” Marina, Patrícia e Natália. Pessoal, sem vocês não teria conseguido, muito obrigado!

Aos nossos novos amigos do CEBAPE, Profa. Graça, Valerinha, Gabi loira, Gabi morena, Cibele e Pâmela e principalmente à querida Profa. Mônica, por ter nos aberto as portas de forma tão gentil e desprendida, Muito obrigado!

Aos professores Alberto Delbem, Marcos José Salvador, Edvaldo Rosa e Sônia Khouri, pela fundamental ajuda para concretização deste trabalho, Muito obrigado!

À todos que direta ou indiretamente me ajudaram!

*“Porque, como a terra produz os seus renovos,  
e como o jardim faz brotar o que nele se  
semeia, assim o Senhor DEUS fará brotar a  
justiça e o louvor para todas as nações”.*

*Isaías 61, 11*

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	09
LISTA DE TABELAS.....	11
.LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Fitoterapia.....	18
2.2 Plantas medicinais e Fitoterápicos.....	19
2.3 Plantas do Pantanal Mato-grossense.....	20
2.3.1 Plantas da família Combretaceae.....	21
2.3.2 Gênero <i>Buchenavia</i> .....	22
2.3.3 <i>Buchenavia tomentosa</i> .....	23
2.4 Leveduras do gênero <i>Candida</i> .....	24
2.4.1 Fatores de virulência.....	24
2.4.2 <i>Candida albicans</i> .....	26
2.4.3 <i>Candida</i> não- <i>albicans</i> .....	27
2.4.3.1 <i>Candida tropicalis</i> .....	28
2.4.3.2 <i>Candida parapsilosis</i> .....	28
2.4.3.3 <i>Candida glabrata</i> .....	29
2.4.3.4 <i>Candida krusei</i> .....	30
2.4.3.5 <i>Candida dubliniensis</i> .....	30
2.5 Antifúngicos.....	31
2.6 Plantas com Potencial Antifúngico.....	32
3 PROPOSIÇÃO.....	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34

<b>4.1 Coleta das folhas de <i>B. tomentosa</i></b> .....	34
<b>4.2 Preparo dos extratos vegetais</b> .....	35
<b>4.3 Teste de difusão em Agar (<i>Screening</i> dos extratos mais ativos)</b> .....	36
<b>4.4 Atividade antifúngica sobre cepas padrão e isolados clínicos- Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos mais ativos</b> .....	38
<b>4.5 Caracterização química dos extratos mais ativos</b> .....	40
<b>5 RESULTADOS</b> .....	42
<b>5.1 Teste de difusão em ágar (<i>Screening</i>)</b> .....	42
<b>5.2 Atividade antifúngica sobre cepas padrão e isolados clínicos- Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos mais ativos</b> .....	46
5.2.1 Resultados para cepas padrão de <i>Candida</i> .....	46
5.2.2 Resultados para os isolados de origem hospitalar.....	48
5.2.3 Resultados para as cepas isoladas de lesões de candidose eritematosa.....	52
<b>5.3 Caracterização química dos extratos mais ativos</b> .....	55
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	62
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	70
<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	71
<b>ANEXO A</b> .....	89
<b>ANEXO B</b> .....	90

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Exsicata da planta *Buchenavia tomentosa*..... 35
- Figura 2 - *Screening* dos 2 extratos mais ativos de *Buchenavia tomentosa* para *Candida albicans* (ATCC: 18804); A= Etanol 70°/72 horas/temperatura ambiente; B= água:5 minutos/100 °C; C= água:60 minutos/55 °C; D= água:72 horas/temperatura ambiente; E= Etanol 99°/72 horas/temperatura ambiente/após maceração com hexano..... 44
- Figura 3 - *Screening* dos 2 extratos mais ativos de *Buchenavia tomentosa* para *Candida tropicalis* (ATCC 13804); A= Etanol70°/72 horas/temperatura ambiente; B= água:5 minutos/100 °C; C= água:60 minutos/55 °C; D= água:72 horas/temperatura ambiente; E= Etanol 99°/72 horas/temperatura ambiente/após maceração com hexano..... 44
- Figura 4 - *Screening* dos 2 extratos mais ativos de *Buchenavia tomentosa* para *Candida parapsilosis* (ATCC 22019); A= Etanol 70°/72 horas/temperatura ambiente; B= água:5 minutos/100 °C; C= água:60 minutos/55 °C; D= água:72 horas/temperatura ambiente; E= Etanol 99°/72 horas/ temperatura ambiente/após maceração com hexano..... 45
- Figura 5 - *Screening* dos 2 extratos mais ativos de *Buchenaviatomentosa* para *Candida glabrata* (ATCC 90030); A= Etanol 70°/72 horas/temperatura ambiente; B= água:5 minutos/100 °C; C= água:60 minutos/55 °C; D= água:72 horas/temperatura ambiente; E= Etanol 99°/72 horas/temperatura ambiente/após maceração com hexano..... 45
- Figura 6 - *Screening* dos 2 extratos mais ativos de *Buchenaviatomentosa* para *Candida dubliniensis* (ATCC 778157); A= Etanol 70°/72 horas/temperatura ambiente; B= água:5 minutos/100 °C; C= água:60 minutos/55 °C; D= água:72 horas/temperatura ambiente; E= Etanol 99°/72 horas/temperatura ambiente/após maceração com hexano..... 46

Figura 7 - Screening dos 2 extratos mais ativos de <i>Buchenavia tomentosa</i> para <i>Candida krusei</i> (ATCC 6258); A= Etanol 70°/72 horas/temperatura ambiente; B= água:5 minutos/100 °C; C= água:60 minutos/55 °C; D= água:72 horas/temperatura ambiente; E= Etanol 99°/72 horas/temperatura ambiente/após maceração com hexano.....	46
Figura 8 - Testes para determinação da Concentração Fungicida Mínima para as cepas padrão: 1- <i>C. albicans</i> (ATCC 18804); 2- <i>C. tropicalis</i> (ATCC 13803); <i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019); B: extrato B; C: extrato C; as setas representam as concentrações em que se observam as CIMs.....	48
Figura 9 - Testes para determinação da Concentração Fungicida Mínima: 4- <i>C. glabrata</i> (ATCC 90030); 5- <i>C. dubliniensis</i> (ATCC 778157); 6- <i>C. krusei</i> (ATCC 6258); B: extrato B; C: extrato C; as setas pretas representam as concentrações em que se observam as CIMs; as setas amarelas representam as concentrações em que se observam as CFMs.....	49
Figura 10 - Espectrometria de massas por injeção direta (M-H) <sup>-</sup> do extrato B (água: 5 minutos/100 °C) de <i>Buchenavia tomentosa</i> ; *ácido gálico; *kaempferol; *eschweilenol; *vitexina; *eschweilenol C; *corilagina; *1 $\alpha$ ,23 $\beta$ -dihidroxi-12-oleaneno-29-ácido-oico-23 $\beta$ -O- $\alpha$ -L-4-acetilramnopiranosida.....	58
Figura 11 - Espectrometria de massas por injeção direta (M+H) <sup>+</sup> do extrato B (água: 5 minutos/100 °C) de <i>Buchenavia tomentosa</i> ; *buchenavianina.....	59
Figura 12 - Espectrometria de massas por injeção direta (M-H) <sup>-</sup> do extrato C (água: 60 minutos/55 °C) de <i>Buchenavia tomentosa</i> *vitexina; *eschweilenol C; *1 $\alpha$ ,23 $\beta$ -dihidroxi-12-oleaneno-29-ácido-oico-23 $\beta$ -O- $\alpha$ -L-4-acetilramnopiranosida.....	60
Figura 13 - Espectrometria de massas por injeção direta (M+H) <sup>+</sup> do extrato C (água: 60 minutos/55 °C) de <i>Buchenavia tomentosa</i> ; *combregenina.....	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Modo de preparo dos extratos e código dos solventes.....	36
Tabela 2 - Resultados (em milímetros) do <i>screening</i> para obtenção dos 2 extratos mais ativos de <i>Buchenavia tomentosa</i> .....	43
Tabela 3 - Valores (em mg/ml) das Concentrações Inibitórias Mínima (CIMs) e Concentrações Fungicidas Mínimas (CFMs) dos 2 extratos mais ativos de <i>Buchenavia tomentosa</i> observadas nas cepas padrão de <i>Candida</i> spp.....	48
Tabela 4 - Valores (em mg/ml) das Concentrações Inibitórias Mínima (CIMs) e Concentrações Fungicidas Mínimas (CFMs) dos 2 extratos mais ativos de <i>Buchenavia tomentosa</i> observadas nos isolados hospitalares de <i>Candida albicans</i> .....	50
Tabela 5 - Valores (em mg/ml) das Concentrações Inibitórias Mínima (CIMs) e Concentrações Fungicidas Mínimas (CFMs) dos 2 extratos mais ativos de <i>Buchenavia tomentosa</i> observadas nos isolados hospitalares de <i>Candida tropicalis</i> .....	51
Tabela 6 - Valores (em mg/ml) das Concentrações Inibitórias Mínima (CIMs) e Concentrações Fungicidas Mínimas (CFMs) dos 2 extratos mais ativos de <i>Buchenavia tomentosa</i> observadas nos isolados hospitalares de <i>Candida parapsilosis</i> .....	52
Tabela 7 - Valores (em mg/ml) das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) e Concentrações Fungicidas Mínimas (CFMs) dos 2 extratos mais ativos de <i>Buchenavia tomentosa</i> observadas nos isolados hospitalares de <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida dubliniensis</i> e <i>Candida krusei</i> .....	53

Tabela 8 - Valores (em mg/ml) das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) e Concentrações Fungicidas Mínimas (CFMs) dos 2 extratos mais ativos de <i>Buchenavia tomentosa</i> observadas nas cepas de <i>Candida albicans</i> isoladas de lesões de candidose eritematosa.....	54
Tabela 9 - Valores (em mg/ml) das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) e Concentrações Fungicidas Mínimas (CFMs) dos 2 extratos mais ativos de <i>Buchenavia tomentosa</i> observadas nas cepas de <i>Candida glabrata</i> e <i>Candida tropicalis</i> isoladas de lesões de candidose eritematosa.....	55
Tabela 10 - Valores de CIM <sub>50</sub> e CIM <sub>90</sub> (em mg/ml) para as cepas de <i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> e <i>Candida parapsilosis</i> .....	56
Tabela 11 - Substâncias bioativas encontradas nos extratos aquosos B (5 minutos/100 °C) e C (60 minutos/55 °C) de <i>Buchenavia tomentosa</i> .....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C. = antes de Cristo

ATCC= American type culture collection

BHI = Brain heart infusion

CFM = Concentração fungicida mínima

CIM = Concentração inibitória mínima

CLSI = Clinical and Laboratory Standards Institute

d.C. = depois de Cristo

Embrapa = Empresa brasileira de pesquisa agropecuária

h = hora

mg = miligrama

ml = mililitro

mm = milímetro

mM = milimolar

MOPS = ácido 3-[N-morfolino]propanesulfônico

NaCl = cloreto de sódio

NCCLS = National Committee for Clinical Laboratory Standards

nm = nanômetros

° C = graus Celsius

OD = densidade ótica

RPMI = Roswell Park memorial institute

µl = microlitro

µm = micrômetro

Teodoro GR. Avaliação da atividade antifúngica dos extratos de *Buchenavia tomentosa* sobre *Candida* spp. [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP-Univ. Estadual Paulista; 2010.

## RESUMO

O interesse pelo desenvolvimento de terapias alternativas para o controle de *Candida* spp., como a pesquisa de compostos naturais com potencial antifúngico, vem crescendo. Estes micro-organismos são importantes causadores de infecções e têm se tornado resistente aos antifúngicos convencionais. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antifúngica de extratos de *Buchenavia tomentosa* sobre *Candida* spp. Inicialmente foi realizado *screening* por meio de teste de difusão em ágar de extratos de *B. tomentosa* obtidos por diferentes métodos para seleção dos dois mais ativos. A seguir, esses extratos foram caracterizados quimicamente através da técnica de espectrometria de massas por injeção direta. As concentrações inibitória mínima e fungicida mínima (CIMs e CFMs) foram determinadas para amostras padrão, isolados clínicos obtidos de pacientes com candidose bucal e cepas de origem hospitalar de *Candida* spp. Os resultados do *screening* demonstraram que os extratos aquosos B (5 minutos/100 °C) e C (60 minutos/55 °C) foram os mais ativos. As CIMs encontradas, em mg/ml, variaram de 0,2 a 25. As CFMs foram verificadas apenas para cepas de *C. krusei* (3,12 a 6,25 mg/ml) e para 4 cepas de *C. tropicalis* (6,25 a 12,5 mg/ml). As cepas mais sensíveis aos extratos foram *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* e as cepas mais resistentes foram *C. albicans* e *C. tropicalis*. O extrato B foi mais efetivo para todos os isolados, exceto para *C. glabrata*. O ácido gálico, corilagina e kaempferol foram encontradas apenas no extrato B. Conclui-se que, exceto os extratos A e E para *C. tropicalis*, todos os extratos de *B. tomentosa* tiveram ação antifúngica para *Candida* spp., sendo os extratos aquosos B e C os mais eficazes.

Palavras chaves: *Candida*. Antifúngicos. Terapias alternativas. Fitoterapia.

Teodoro GR. Avaliação de atividade antifúngica de extratos de *Buchenavia tomentosa* em *Candida* spp. [dissertação]. São José dos Campos: Escola de Odontologia de São José dos Campos, UNESP-Univ. Estadual Paulista; 2010.

## ABSTRACT

The interest on the development of alternative therapies for *Candida* spp. control, as searching of natural compounds with antifungal potential, has increased. These microorganisms are important causative agents of infections and the resistance to conventional antifungals has been growing. The aim of this study was to evaluate the antifungal activity of *Buchenavia tomentosa* extracts on *Candida* spp. Screening by using agar diffusion test was performed to select two most active extracts. Then, the extracts were chemically characterized by direct infusion mass spectrometry. Minimal inhibitory and fungicide concentrations (MICs and MFC) were determined for standard strains, clinical isolates from oral candidosis patients and nosocomial isolates. The findings of screening showed that aqueous extract B (5 min./100 °C) and C (60 min./55 °C) were the most active. Values of MIC found in, mg/ml, varied from 0.2 to 25. Values of MFC were observed for *C. krusei* (3.12 to 6.25 mg/ml) and for 4 *C. tropicalis* isolates (6.25 to 12.5 mg/ml). The most susceptible species were *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* and *C. parapsilosis* and the most resistant were *C. albicans* and *C. tropicalis*. Extract B was effective against all the isolates, except for *C. glabrata*. Galic acid, corilagin and kaempferol were found only in extract B. It could be concluded that, except extracts A and E against *C. tropicalis*, all extracts of *B. tomentosa* had antifungal activity against *Candida* spp. Besides, the aqueous extracts B and C were the most effective.

Keywords: *Candida*. Antifungals. Alternatives therapies. Phytotherapy.

## 1 INTRODUÇÃO

Há milhares de anos, as plantas medicinais vêm sendo utilizadas pelo homem com finalidades terapêuticas através do conhecimento empírico, na observação do comportamento dos animais e a verificação do efeito da ingestão do vegetal (Turolla, Nascimento, 2006; Tomazzoni et al., 2006). Estima-se que o número de espécies de plantas superiores que foram descritas varia de 250.000 a 750.000 e cerca de 120 substâncias derivadas de plantas usadas para fins medicinais são obtidas de aproximadamente 90 plantas (Farnsworth, 1997). No entanto, ainda há desafios a serem superados, especialmente no que se refere à falta de evidência científica da qualidade desses produtos. De acordo com Maciel et al. (2002), o Brasil é o país com o maior número de espécies vegetais no mundo, mas 99,6% da flora nacional ainda não foram exploradas (Brito, Brito, 1993).

O Pantanal Mato-grossense foi reconhecido como Reserva da Biosfera pela UNESCO no ano 2000 (Embrapa, 2007). Pott e Pott (1994) reuniram dados relacionados aos diversos usos de 520 espécies vegetais do Pantanal. Apesar da disponibilidade dessas informações, a atividade biológica dessas plantas é pouco estudada cientificamente. Algumas dessas plantas pertencem ao gênero *Buchenavia*. O uso medicinal de plantas desse gênero ainda não está bem estabelecido. Todavia, estudos anteriores sobre o isolamento moléculas bioativas de plantas desse gênero para fins terapêuticos são encontrados (Marquete, Valente, 2005).

A espécie *B. tomentosa*, de nome popular Tarumarana, possui fruto comestível, ácido, folhas que são utilizadas para preparo de chá e madeira utilizada para varas de porteira, caibros, tábuas e como

lenha (Pott, Pott, 1994). É utilizado na medicina popular (Guarim Neto; Carniello, 2007), mas não foram detectados na atual literatura científica estudos a respeito de seu uso para fins medicinais.

Leveduras do gênero *Candida* são consideradas patógenos oportunistas e acometem principalmente indivíduos imunocomprometidos, como pacientes HIV positivos, pacientes com câncer sob quimioterapia, transplantados em uso de medicamentos imunossupressores e diabéticos em estágios avançados da doença (Aperis et al. 2006; Richardson, 2005). Os fatores de virulência mais conhecidos dessas leveduras são adesão às células do hospedeiro, secreção de enzimas hidrolíticas, formação de hifas e desenvolvimento de biofilme (Williams et al., 2011).

*Candida* spp. ocupam hoje entre o terceiro e quarto lugar como causadores de infecções nosocomiais (Wisplinghoff et al., 2004; Pfaller, Diekema, 2007). Estes micro-organismos possuem a capacidade de formar biofilme (Raad, 1998; Ramage et al., 2006) e vêm demonstrando resistência aos azólicos, polienos e equinocandinas (Akins, 2005; White et al., 1998; Yu et al., 2005), principalmente quando dispostas em biofilmes (LaFleur et al., 2006; Seneviratne et al., 2008). Até a atualidade a quantidade de drogas disponíveis para seu tratamento ainda é pequena (Yu et al., 2005), torna-se de grande interesse o desenvolvimento de meios alternativos para o controle desses microrganismo (Silver, Bostian, 1993). Um desses meios é a descoberta de compostos naturais com potencial antifúngico (Schmourlo et al., 2005), já que o impacto de compostos naturais sobre doenças infecciosas humanas tem merecido muito interesse nas últimas décadas (Leitão et al., 2004; Takarada et al., 2004).

Baseando-se no exposto, o presente estudo propõe avaliar a atividade antifúngica de extratos das folhas de *B. tomentosa* sobre *Candida* spp.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Fitoterapia

Há milhares de anos, as plantas medicinais vêm sendo utilizadas pelo homem com finalidades terapêuticas através do conhecimento empírico, na observação do comportamento dos animais e a verificação do efeito da ingestão do vegetal. O seu uso popular foi difundido de geração em geração e descrito nas diversas farmacopéias (Tomazzoni et al., 2006; Turolla, Nascimento, 2006).

A fitoterapia tem seu primeiro registro conhecido como “Pen-t’são”, matéria médica chinesa, datado no ano de 2.700 a.C, no qual há uma relação de inúmeras drogas de origem vegetal. O primeiro manuscrito é o Papiro de Ebers, encontrado no Egito, do ano de 1.500 a.C, onde foram descritas 700 indicações de drogas locais e exóticas utilizadas no tratamento de doenças da patologia interna, de afecções oculares, ginecológicas e dermatológicas (Ferro, 2006).

Desde 2.300 a.C, egípcios, assírios e hebreus cultivavam diversas ervas e traziam de suas expedições muitas outras e, assim, criavam diversas classes de medicamentos. Entre os anos de 460-377 a.C., na Grécia antiga, Hipócrates - denominado o “Pai da Medicina”- reuniu em sua obra “*Corpus Hipocratium*” a indicação de medicamentos vegetais para cada enfermidade e seu tratamento adequado, auxiliando no conhecimento do valor terapêutico ou tóxico das plantas (Martins et al., 2000).

O tratado “*De Materia Medica*”, escrito pelo botânico grego Pedanios Dioscorides, no ano de 78 d.C., foi referência por mais

de catorze séculos e descreve cerca de 600 plantas medicinais, além de produtos minerais e animais (Turolla, Nascimento, 2006).

Em 1803, o farmacêutico Friedrich Wilhelm Adam Sertürner, marcou o início da extração do princípio ativo das plantas, isolando a morfina retirada da papoula (*Papaver somniferum*). Posteriormente, outras substâncias foram isoladas, como por exemplo: em 1819, a quinina e a quinidina obtidas da *Cinchona* spp., e a atropina da Beladona (*Atropa belladonna*) em 1831, que substituíram os extratos vegetais das mesmas (Turolla, Nascimento, 2006).

No Brasil, a primeira referência sobre plantas medicinais foi feita por Pero Vaz de Caminha (1500-1600) em sua carta a Dom Manuel, quando descreve sobre a beleza da nossa flora e cita algumas com propriedades medicinais. Destacam-se também a contribuição dada pelos jesuítas na divulgação dos medicamentos usados pelas populações indígenas do Brasil (Ferro, 2006).

## **2.2 Plantas Medicinais e Fitoterápicos**

Embora as propriedades medicinais e toxicológicas das plantas fossem utilizadas de maneira empírica, após a comprovação científica através dos ensaios farmacológicos, os vegetais começaram a ser utilizados com maior confiança e credibilidade, sendo preservados na tradição dos povos, no folclore e costumes religiosos, abrangendo as mais diversas etnias e níveis populacionais (Mitidiero, 2002).

Estima-se que o número de espécies de plantas superiores que foram descritas varia de 250.000 a 750.000 e cerca de 120 substâncias derivadas de plantas usadas para fins medicinais são obtidas de aproximadamente 90 plantas (Farnsworth, 1997). No entanto, ainda há desafios a serem superados, especialmente no que se refere à

falta de evidência científica da qualidade de alguns produtos. Assim, Organização Mundial de Saúde estimula sua avaliação, para criar uma evidência consistente com relação à sua segurança e efetividade (World Health Organization, 2002), uma vez que o estudo das plantas medicinais com métodos sofisticados estabelece uma relação racional entre o seu uso e a cura das doenças por meio de substâncias biologicamente ativas presentes nas drogas vegetais (Colegate, Molyneux, 1993).

De acordo com Maciel et al. (2002), o Brasil é o país com o maior número de espécies vegetais no mundo. No entanto, 99,6% da flora nacional ainda não foram exploradas (Brito, Brito, 1993). Deste modo, tendo por base as diretrizes da Organização Mundial da Saúde (World Health Organization, 2002) e a grande biodiversidade do território nacional, o Governo Federal criou, em 2006, a “Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterapia” com o objetivo de “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” (Brasil, 2006).

### **2.3 Plantas do Pantanal Mato-grossense**

O Pantanal Mato-grossense é uma das maiores extensões úmidas contínuas do planeta e foi reconhecida como Reserva da Biosfera pela UNESCO no ano 2000 (EMBRAPA, 2007). Este bioma, que se estende pelos Estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, é ocupado em 70% de sua superfície pela flora do cerrado (Adamoli, 1981). Pott e Pott (1994) reuniram dados relacionados aos diversos usos de 520 espécies vegetais do Pantanal. Apesar da disponibilidade dessas

informações, a atividade biológica dessas plantas é pouco estudada cientificamente.

### 2.3.1 Plantas da família Combretaceae

Plantas da família Combretaceae ocorrem nas regiões tropicais e subtropicais do mundo e inclui 20 gêneros. O número de espécies pode variar de acordo com a literatura, sendo descritas entre 300 e 475. No Brasil, ocorrem seis gêneros e 78 espécies (Tan et al., 2002; Marquete, Valente, 2005). A maioria das espécies pertence aos gêneros *Combretum*, *Terminalia* e *Quisqualis*. As demais pertencem aos gêneros *Anogeissus*, *Buchenavia*, *Bucida*, *Calopyxis*, *Calycopteris*, *Conocarpus*, *Dansiea*, *Guiera*, *Laguncularia*, *Lumnitzera*, *Macropteranthes*, *Melostemon*, *Pteleopsis*, *Quisqualis*, *Strephonema*, *Terminaliopsis* e *Thiloa*. (Klopper et al., 2006).

Muitas espécies de Combretaceae são utilizadas como plantas medicinais em vários continentes no mundo. Curandeiros africanos têm usado plantas dos gêneros *Combretum* e *Terminalia* para tratamento de desordens abdominais, dor nas costas, febre, infecções bacterianas como lepra, gonorréia, pneumonia, gengivites, tuberculose, sífilis e cárie, tratamento de hipertensão, cânceres, parasitoses, problemas do trato gastrointestinal (Oliver-Bever, 1986; Iwu, 1993; Hutchings et al., 1996; Neuwinger, 1996; Fyhrquist et al., 2002; Burkhill, 1985). Do ponto de vista científico, já foram isolados diversos componentes bioativos de plantas da família Combretaceae, pertencentes ao grupo dos polifenóis, como flavonóides (Martini et al., 2004), ao grupo dos terpenóides, como triterpenos glicosídeos (Adnyana et al., 2000) e triterpenóides (Angeh et al., 2007a) e ao grupo dos alcalóides, como flavonóides-alcalóides (Beutler et al., 1992) e beta-carbolina (Fiot et al.,

2006). Essas moléculas podem ter poder antimicrobiano, antiinflamatório e antioxidante (Eloff et al., 2001; Martini et al., 2004; Masoko, Eloff, 2006).

O efeito antibacteriano e antifúngico de plantas da família Combretaceae, principalmente dos gêneros *Combretum* e *Terminalia* vêm sendo demonstrado na literatura. Um estudo de Eloff (1999) demonstrou poder antibacteriano de diversos extratos acetônicos de folhas de espécies de *Combretum*, *Terminalia*, *Pteleopsis* e *Quisqualis* contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*. Martini et al. (2004) demonstraram a atividade antibacteriana de moléculas extraídas de *Combretum erythrophyllum* contra *Vibrio cholerae*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus* e *Shigella sonnei*. O poder antifúngico de *Combretum* spp. e *Terminalia* spp. contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Microsporium canis* e *Sporothrix schenckii*, de diversos tipos de extratos de *Terminalia* e *Combretum* também foi descrito (Masoko et al., 2005; Masoko, 2006).

### 2.3.2 Gênero *Buchenavia*

O gênero *Buchenavia* caracteriza-se por árvores com folhas alternas (uma folha para cada nó), aglomeradas no ápice dos ramos, também por indumento somente com tricomas combretáceo-compartimentados, por flores sem pétalas, estames com anteras adnatas ao filete e frutos sem alas. O uso medicinal de plantas desse gênero ainda não está completamente estabelecido. Todavia, foram relatados na literatura alguns trabalhos que tentaram isolar moléculas bioativas de plantas desse gênero para fins terapêuticos (Marquete, Valente, 2005). Beutler et al. (1992) verificaram que alguns alcalóides flavonóides isolados das folhas de *Buchenavia capitata* apresentaram moderada

atividade anti-HIV, entretanto, também apresentaram alta citotoxicidade. Li XC et al. (2002) verificaram que componentes isolados de extrato etanólico da raiz de *Buchenavia parviflora* apresentaram atividade contra a enzima ácido graxo sintase, uma importante enzima na biossíntese de lipídeos de células eucarióticas, contudo, não apresentaram atividade antifúngica.

### 2.3.3 *Buchenavia tomentosa*

A espécie *B. tomentosa*, de nome popular Tarumarana, é uma árvore com cerca de 30 metros de altura, 21-35 cm de diâmetro com tronco cilíndrico com sapopemas e ramos superiores acinzentados. No ápice da árvore se inserem as folhas que são do tipo ferrugíneas ou rubiginosas pubescentes, elípticas ou obovadas, tomentosas com as nervuras primária e secundárias vilosas na face abaxial, com nervação do tipo broquidódromo, nervuras secundárias proeminentes, formando um ângulo obtuso com a nervura primária e também pecíolo de 0,4 a 0,6 cm de comprimento. O ápice dessas folhas são arredondado a levemente emarginado. (Marquete, Valente, 2005). Seu fruto é comestível e ácido, suas folhas são utilizadas para preparo de chá e sua madeira é usada para varas de porteira, caibros, tábuas e como lenha (Pott, Pott, 1994). Batista et al. (2010) relatou atividade antifúngica do extrato etanólico dos frutos de *B. tomentosa* contra cepas padrão de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. neoformans*, utilizando a metodologia sugerida pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards/Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS/CLSI, 2002). Todavia, não foi relatada ainda na literatura nenhuma informação sobre outros tipos de extratos desta planta, bem como sua ação nos

fatores de virulência destas leveduras, seja em cepas padrão ou isolados clínicos.

## **2.4 Leveduras do gênero *Candida***

Infecções fúngicas vêm aumentando substancialmente em número e gravidade nas últimas duas décadas, especialmente em pacientes imunocomprometidos hospitalizados com doenças graves. Os principais patógenos fúngicos causadores de infecções nosocomiais são do gênero *Candida* (Pfaller, Diekema, 2007).

Leveduras do gênero *Candida* são consideradas patógenos oportunistas e acometem principalmente indivíduos imunocomprometidos, como pacientes HIV positivos, pacientes com câncer sob quimioterapia, transplantados em uso de medicamentos imunossupressores e diabéticos em estágios avançados da doença (Aperis et al. 2006; Richardson, 2005). Desde 1995, vêm sendo consideradas a quarta maior causa de septicemias hospitalares, com o índice de mortalidade atingindo 39% das infecções. Quando são consideradas apenas as septicemias em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), a mortalidade pode chegar a 47% (Wisplinghoff et al., 2004).

### **2.4.1 Fatores de virulência**

Muitos fatores de virulência têm sido propostos na patogenidade das espécies de *Candida*, sendo que a adesão às células do hospedeiro, secreção de enzimas hidrolíticas, formação de hifas e

desenvolvimento de biofilme aparentemente têm maior importância (Williams et al., 2011).

A aderência de *Candida* nas superfícies do hospedeiro é necessária para uma inicial colonização e contribui para a sua permanência no mesmo. As células de *Candida* se aderem em diversos tipos de células do hospedeiro, como células epiteliais, endoteliais e fagocíticas (Nobile et al., 2008).

Janeway e Medzhitov (2002) sugerem um modelo onde grupos moleculares de associação ao patógeno, conhecidos como PAMPs (do inglês *Pathogen-associated molecular patterns*) interagem com a superfície das células do hospedeiro. Nas leveduras do gênero *Candida*, principalmente em *C. albicans*, são consideradas PAMPs alguns componentes de sua parede celular tais como mananas, manoproteínas, beta-glucanos e quitina (Netea et al., 2008). A maioria dos estudos desses tipos de moléculas é realizada em leucócitos; logo, a importância dos PAMPs nas células epiteliais e nas mucosas ainda não está bem estabelecida (van der Meer et al., 2010).

Espécies de *Candida* secretam diversas enzimas hidrolíticas, tais como aspartil proteinases, fosfolipases, lipases, fosfomonoesterases e hexoaminidases (Odds, 1994). As enzimas aspartil proteinases estão envolvidas na evasão destes micro-organismos do sistema imunológico do hospedeiro, como por exemplo, hidrólise de IgA secretora presente nas mucosas, bem como na invasão e destruição do tecido do mesmo. As fosfolipases também estão envolvidas com a invasão e destruição do tecido do hospedeiro e sua atividade é acentuada quando ocorre o contato das hifas produzidas por estas leveduras com o tecido do hospedeiro (Williams et al., 2011).

As leveduras do gênero *Candida*, em particular *C. albicans*, podem apresentar modificações morfológicas dependendo das condições em que se encontram. Os tipos possíveis apresentados são na forma de levedura, pseudohifas ou hifas verdadeiras. Acredita-se que a

formação de hifas tenha um importante papel na invasão de tecidos e biomateriais, uma vez que mutantes de *C. albicans* com baixa capacidade de formação de hifas, bem como espécies não-*albicans* com formação insuficiente destas, exibem menor habilidade para invadir tecidos (Jayatilake et al., 2006). Além disso, a formação de hifas confere a *Candida* spp. maior resistência aos fagócitos quando comparados com as formas leveduriformes, sendo significativa para sua patogenicidade (Williams et al., 2011). Outro fator essencial de virulência de *Candida* spp. é a sua capacidade de se aderir em superfícies e formar biofilmes. O biofilme pode se desenvolver tanto em superfícies biológicas quanto superfícies inertes, como cateteres intravasculares, *shunts* pulmonares, *stents* endovasculares, próteses e implantes (Raad, 1998; Ramage et al., 2006). A formação de biofilme é importante na patogenicidade de *Candida* porque ele se torna uma barreira contra a penetração de fatores imunológicos do hospedeiro e de drogas antimicrobianas (Hawser, Douglas, 1995; Vuong et al., 2004). Isto ocorre devido à formação de uma matriz extracelular polissacarídica, que inibe a difusão das moléculas do antimicrobiano para o interior do biofilme ou pela ação iônica do biofilme, que diminui sua ação esperada (Al-Fattani, Douglas, 2004; Baillie, Douglas, 2000).

#### 2.4.2 *Candida albicans*

*Candida albicans* é um fungo comensal da microflora humana residente na cavidade bucal, no trato gastrointestinal e urogenital. Considerado um patógeno oportunista, é comumente causa de infecções, como estomatite protética e outras candidoses bucais, e também infecções do trato urinário. Além do mais, podem também provocar infecções sistêmicas severas, principalmente em pacientes

imunocomprometidos, como transplantados, sob quimioterapia, portadores de AIDS e de Hepatite C. É considerada a espécie de *Candida* mais patogênica para os seres humanos (Pitarch et al., 2006). A capacidade dimórfica dessa levedura, ou seja, a habilidade de apresentar-se na forma unicelular, hifas e pseudohifas, é considerada um importante fator de virulência que auxilia esse microrganismo na formação do biofilme (Stoldt et al., 1997). Estudos têm sugerido que a baixa atividade metabólica, expressão de genes induzidos pelo contato, presença de matriz extracelular e maior capacidade antioxidante estão envolvidos com a resistência antifúngica relacionadas ao biofilme (LaFleur et al., 2006; Seneviratne et al., 2008).

#### 2.4.3 Espécies de *Candida* não-*albicans*

A maior parte dos casos de candidoses tem sido atribuída a *C. albicans*. Entretanto, espécies de *Candida* não-*albicans* (CNA) têm sido comumente identificadas e a prevalência dessas espécies em infecções humanas está mudando nos últimos anos (Silva et al., 2009). Na década de 80, de acordo com Kiehn et al. (1980), *C. albicans* representavam 68% de *Candida* spp. isoladas de outros sítios, além do sangue, de pacientes com câncer, enquanto *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* representavam apenas 12,3, 10,3 e 3,0% dos isolados, respectivamente. Todavia, mais recentemente, 60% dos casos relatados de fungemia foram atribuídos a CNA (Basseti et al., 2006).

#### 2.4.3.1 *Candida tropicalis*

*Candida tropicalis* tem sido considerada como emergente e é atualmente a segunda ou terceira espécie mais comumente envolvida em candidemias, especialmente em pacientes oncológicos (Weinberger et al., 2005; Nucci, Colombo, 2007). Além disso, o crescimento da incidência de *C. tropicalis* como agente causador de infecções hospitalares no trato urinário e infecções neonatais vem sendo reportado (Rho et al., 2004; Canpolat et al., 2011). Estudos em animais demonstraram que *C. tropicalis* pode ser tão virulenta e patogênica quanto *C. albicans* (Wingard, 1995; Abi Said, Anaissie, 1998). Além disso, resistência ao fluconazol, voriconazol, itraconazol e fluocitosina tem sido reportada (Borg-von Zepelin et al., 2007; Lee et al., 2010, Pfaler et al., 2010; Panizo et al., 2009).

#### 2.4.3.2 *Candida parapsilosis*

*Candida parapsilosis* é geralmente considerada como uma das espécies de levedura menos virulentas. Entretanto, mais recentemente, esta levedura tem sido causa de candidemia, pancreatite, endoftalmia e peritonite (Bonassoli, 2005; van Asbeck et al., 2009). Fatores importantes que têm contribuído para o crescimento de infecções por este fungo é o uso de nutrição parenteral ou uso de cateter venoso central (Eggimann et al., 2003, Krcmery, Barnes 2002). Infecções primárias do trato urinário por *C. parapsilosis* vêm crescendo nos últimos anos, principalmente pela presença de cateteres urinários (Camacho et al. 2007; Passos et al. 2005; Tamura et al. 2003). A aderência de microrganismos a superfícies é um fator determinante para sua

colonização e possível infecção (Tamura et al. 2003). Além disso, *C. parapsilosis* é frequentemente isolado em superfícies físicas no ambiente hospitalar (Girmenia et al., 1996; Jarvis, 1995). Surtos de infecções nosocomiais por *C. parapsilosis* também têm sido descritos e têm sido atribuídos a infecção cruzada a partir de mãos de profissionais da área da saúde (Bonassoli, 2005). Sua resistência ao fluconazol, voriconazol, itraconazol tem sido reportada (Lee et al., 2010, Pfaler et al., 2010; Panizo et al., 2009; Kiraz, Oz, 2011).

#### 2.4.3.3 *Candida glabrata*

*Candida glabrata* é a segunda levedura mais frequentemente isolada da flora normal dos seres humanos (Hedderwick et al., 1998). Recentemente, se tornou um emergente agente de infecções nosocomiais e ainda pouco é conhecido sobre sua epidemiologia (Hajjeh et al., 2004). Esta levedura tem uma importância particular porque possui alta resistência intrínseca a certos agentes antifúngicos, principalmente os azóis (Tsai, Bobek, 1997). Estudos vêm demonstrando resistência dessa levedura aos azóis como fluconazol, voriconazol, itraconazol e pozaconazol, e também a equinocandinas como anidulafungina, caspofungina e micofungina (Lee et al., 2010, Pfaler et al., 2010; Panizo et al., 2009; Kiraz, Oz, 2010). Fatores como o uso de antibióticos de largo espectro, de cateter venoso central, problemas renais, nutrição parenterais e pacientes em unidades de terapia intensiva são relatados como importantes fatores para infecção por *C. glabrata* (Malani et al., 2005).

#### 2.4.3.4 *Candida krusei*

*Candida krusei* é um patógeno fúngico associado a pacientes imunocomprometidos. Sua resistência intrínseca ao fluconazol e a diminuição de sua susceptibilidade a outros agentes antifúngicos são fatores problemáticos. Quando ocorre a colonização por este fungo, a disseminação pode ser rápida (Hager et al., 2010). Infecções ou colonizações invasivas por este fungo têm sido associadas à terapia antifúngica profilática (Vos et al., 2006; Wingard et al., 1991; Hope et al., 2002). Estudos vêm demonstrando resistência dessa levedura aos outros azóis como voriconazol, itraconazol e pozaconazol, e também a equinocandinas como caspofungina (Lee et al., 2010, Pfaler et al., 2010; Panizo et al., 2009; Kiraz, Oz, 2010).

#### 2.4.3.5 *Candida dubliniensis*

*Candida dubliniensis*, primeiramente descrita na Irlanda, compartilha muitas semelhanças fenotípicas com *C. albicans* (Sullivan et al., 2004). Apesar das semelhanças fenotípicas e genotípicas, uma clara diferença sobre as suas capacidades em causar doenças pode ser observado (Stokes et al., 2007). Estudos *in vivo* sugerem que *C. dubliniensis* é menos virulenta que *C. albicans* (Sullivan et al., 2004; Gilfillan et al., 1998). De acordo com Stokes et al. (2007), a menor virulência de *C. dubliniensis* em relação a *C. albicans* parece ser multifatorial; todavia, pode estar particularmente correlacionada com sua menor capacidade de aderência e invasão do tecido epitelial da boca e do trato gastrointestinal, associada com sua capacidade limitada de produzir hifas *in vivo*. Apesar de sua menor virulência, *C. dubliniensis* tem sido

relatada como causadora de candidemia (Asmundsdóttir et al., 2008; Metwally et al., 2007; Chan, 2005) e sua resistência aos azóis vêm sendo descrita (Chunchanur et al., 2009; Salgado-Parreño et al., 2007).

## 2.5 Antifúngicos

As classes mais eficazes dos agentes antifúngicos utilizados no tratamento de infecções por *Candida* spp. são os azólicos, polienos e equinocandinas (Akins, 2005), que representam o limitado arsenal de drogas antifúngicas no combate de infecções por leveduras do gênero *Candida* (White et al., 1998; Yu et al., 2005). Estes agentes também têm limitações significativas em uso na rotina clínica. Os antifúngicos azólicos são fungistáticos e seu uso é prejudicado pelo surgimento de espécies de *C. albicans* resistentes a azóis (White et al., 1998; Yu et al., 2005). Os polienos têm efeitos secundários adversos, tais como a nefrotoxicidade e insuficiência renal (Wingard et al., 1999; Bates et al., 2001). Os antifúngicos equinocandina são caros e têm sido associados à febre, tromboflebite e hepatocitotoxicidade (Johnson, Perfect, 2003; Rex et al., 2001; Rybowicz; Gurk-Turner, 2002).

Uma vez que infecções por *Candida* spp. ocupam hoje entre o terceiro e quarto lugar como causadores de infecções nosocomiais (Wisplinghoff et al., 2004; Pfaller; Diekema, 2007), que estes microrganismos possuem a capacidade de formar biofilme em diversas superfícies (Raad, 1998; Ramage et al., 2006) e vêm demonstrando resistência aos antifúngicos (White et al., 1998; Yu et al., 2005) principalmente quando dispostas em biofilmes (LaFleur et al., 2006; Seneviratne et al., 2008) e devido à pequena quantidade de drogas disponíveis para seu tratamento (Yu et al., 2005), torna-se de grande interesse o desenvolvimento de meios alternativos para o controle desses

microrganismo (Silver; Bostian, 1993), já que o impacto de compostos naturais sobre doenças infecciosas humanas tem merecido muito interesse nas últimas décadas (Leitão et al., 2004; Takarada et al., 2004).

## 2.6 Plantas com Potencial Antifúngico

Uma alternativa para os problemas encontrados com o uso dos antifúngicos convencionais pode ser a descoberta de compostos naturais com potencial antifúngico (Schmourlo et al., 2004), já que o uso empírico de drogas antifúngicas tem contribuído para a diminuição da susceptibilidade (Basseti et al., 2006; Vazquez et al., 1993).

O Brasil é um país conhecido mundialmente devido a sua diversidade vegetal e pela variedade de produtos com ação medicinal, sendo assim, as espécies vegetais são muito utilizadas como antifúngicos nas suas diversas regiões (Menezes et al., 2009). O estudo de Braga et al. (2007) encontrou potencial antifúngico para aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e para o cajueiro (*Anacardium occidentale* L). Neste mesmo estudo, plantas como alfavaca (*Ocimum gratissimum*), guandu (*Cajanus cajan*) e pimenta-de-macaco (*Piper aduncum*) apresentaram potencial antifúngico contra *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. Extrato etanólico dos frutos de *Buchenavia tomentosa* também já teve sua ação antifúngica demonstrada para leveduras do gênero *Candida* e *C. neoformans* (Batista et al., 2010).

### 3 PROPOSIÇÃO

#### 3.1 Objetivo geral:

Avaliar a atividade antifúngica de extratos de *B. tomentosa* sobre *Candida* spp.

#### 3.2 Objetivos específicos:

- a) Avaliar a atividade antifúngica de diferentes métodos de obtenção de extratos de *B. tomentosa* sobre cepas padrão de *Candida* spp. para seleção de 2 extratos mais ativos (*screening*);
- b) Avaliar a atividade antifúngica e a variação intra-espécies da ação antimicrobiana dos extratos mais ativos de *B. tomentosa* sobre isolados de *Candida* spp. de origem hospitalar, de lesões de candidoses bucais e também cepas padrão, através da determinação da CIM e CFM;
- c) Caracterizar quimicamente os extratos mais ativos.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

O presente trabalho foi realizado em colaboração com o Prof. Adj. Alberto Delbem (FOA/UNESP), com Prof. Dr. Marcos José Salvador (IB/UNICAMP) e com a Prof<sup>a</sup> Dra. Sônia Khouri (NUFABI/UNIVAP).

### **4.1 Coleta das folhas de *B. tomentosa***

Os exemplares das plantas foram coletados na região pantaneira no período de inundação. As plantas foram coletadas no município de Corumbá, no estado de Mato Grosso do Sul (Latitude: 19°0'42.95" sul; Longitude: 57°40'22.99" oeste). A identificação da espécie foi realizada pelo botânico Antônio Arantes B. Sobrinho. Foi feita uma exsicata (Figura 1) com um exemplar da planta, que foi depositada junto ao herbário da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) com a numeração 154259.



Figura 1 - Exsicata da planta *Buchenavia tomentosa*.

## 4.2 Preparo dos extratos vegetais

Esta fase do estudo foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Marcos José Salvador (IB/UNICAMP). Os extratos foram preparados de acordo com parâmetros pré-estabelecidos, nas quais somente folhas com aspecto sadio foram utilizadas. Estas foram secas em estufa a 38 °C e pulverizadas em seguida (Navarro et al., 1998). Para todos os extratos, foi utilizada a proporção de 20 gramas de pó / 400 ml solvente.

Os extratos aquosos foram obtidos por decocção em água deionizada por 5 minutos a 100 °C, por 1 hora a 55 °C ou por 72 horas a temperatura ambiente (Tsuchiya et al., 1994). Os extratos etanólicos e

hexânicos foram macerados por 72 horas a temperatura ambiente, filtrados em filtro de papel e concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida e temperatura de 60 a 70 °C. Os extratos aquosos e hidroalcoólicos foram esterilizados por filtração com membranas de éster de celulose de 0,22 µm e liofilizados (Tabela 1). O extrato hexânico não foi utilizado devido à sua fraca atividade antimicrobiana observada em estudo piloto.

Tabela 1 - Modo de preparo e código dos solventes

Código	Solvente	Tempo	Temperatura	Processamento
A	Etanol 70 °	72 h	temp. ambiente	liofilização
B	Água	5 min.	100 ° C	liofilização
C	Água	60 min.	55 ° C	liofilização
D	Água	72 h	temp. ambiente	liofilização
E*	Etanol 99 °	72 h	temp. ambiente	evaporação do solvente

\*Após a maceração com hexano, 72 horas, temperatura ambiente. min.: minutos  
temp.: temperatura h: horas

#### 4.3 Teste de difusão em ágar (**Screening dos extratos mais ativos**)

O objetivo desta etapa foi selecionar os extratos mais ativos de *B. tomentosa* para posterior da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Para tal, foram utilizadas as seguintes cepas de referência: *C. albicans* ATCC 18804, *C. tropicalis* ATCC 13803, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. krusei* ATCC 6258 e *C. dubliniensis* ATCC 778157.

A metodologia utilizada para triagem da atividade antifúngica in vitro dos extratos foi a de difusão em ágar pela técnica do poço com dupla camada de ágar (Holder, Boyce, 1994). Para tal, alíquotas de 10 ml de um meio de cultura contendo 5 ml de RPMI 1640

líquido preparado sem bicarbonato de sódio, com L-alanina, acrescido com 2% de glicose, tamponado em pH 6,5 com MOPS (ácido 3-[N-morfolino]propanesulfônico), esterilizado por filtração e 2 vezes concentrado e mais 5 ml de ágar a 3% esterilizado em autoclave e com temperatura de aproximadamente 50 °C, foi colocado em placas de Petri estéreis com tamanho de 90 x 15 mm, formando assim uma base no fundo das placas (camada base).

Os microrganismos foram semeados em ágar Sabouraud dextrose. Após 24 horas de incubação a 37 °C, os inóculos foram preparados em solução fisiológica estéril 0,9% na concentração  $10^6$  células/ml utilizando espectrofotômetro, conforme prévia padronização das densidades ópticas (OD) e dos comprimentos de onda. Para *C. albicans*, utilizou-se OD= 0,380 e o comprimento de onda utilizado foi 550 nm. Para *C. parapsilosis*, utilizou-se OD= 0,380 e o comprimento de onda 530 nm. Para o restante das espécies, utilizou-se OD=0,280 e comprimento de onda de 530 nm.

A camada *seed* foi obtida adicionando-se 100 µl do inóculo em 10 ml do mesmo meio de cultura acima descrito. Após homogeneização, o ágar contendo o inóculo foi vertido sobre a camada base. O volume final (camada base + camada *seed*) na placa foi de 20 ml. Após completa solidificação do meio, orifícios de aproximadamente 5 mm de diâmetro foram confeccionados no ágar com auxílio de canudos plásticos esterilizados. Em seguida, os poços receberam 50 µl dos extratos ressuspensos no meio de cultura RPMI 1640 (sem bicarbonato de sódio, com L-alanina, acrescido com 2% de glicose, tamponado em pH 6,5 com MOPS, esterilizado por filtração e 2 vezes concentrado) em uma concentração de 50 mg/ml. Como controle negativo foi utilizado água destilada estéril e como controle positivo foi utilizado anfotericina B na concentração 2 µg/ml. Foi aguardado um período de 1 hora para permitir a difusão dos extratos antes de incubar as placas em estufa a 37 °C durante 24 horas.

Após o período de incubação, os halos de inibição foram verificados com auxílio de uma lupa estetoscópica e medidos com auxílio de uma régua. Os dois extratos que produziram halos iguais ou maiores que 7 mm foram selecionados para realização dos testes de Concentração Inibitória Mínima, de acordo com parâmetro proposto por Nascimento et al. (2000).

#### **4.4 Atividade antifúngica sobre cepas padrão e isolados clínicos - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos extratos mais ativos**

Foi considerada a CIM do extrato vegetal a menor concentração capaz de inibir o crescimento fúngico. Foram obtidos valores de CIM para as amostras padrão *C. albicans* ATCC 18804, *C. tropicalis* ATCC 13803, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. krusei* ATCC 6258 e *C. dubliniensis* ATCC 778157.

Além das amostras padrão, foram também avaliadas amostras clínicas previamente de candidoses nosocomiais (candidemia, lavado brônquico, entre outros) as quais foram coletadas e identificadas previamente no trabalho de Khouri (2010) com aprovação do comitê de ética e pesquisa com seres humanos do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP) sob o número de protocolo 702/CEP (ANEXO A). As amostras foram armazenadas em coleção (BHI + glicerol a 20%, congeladas a -20 °C). Foram incluídas no estudo 35 *C. albicans*, 19 *C. tropicalis*, 20 *C. parapsilosis*, 8 *C. glabrata* e 1 *C. krusei*. Além disso, foram incluídas 5 cepas de *C. dubliniensis* isoladas de candidose orofaríngea de pacientes hospitalizados e conservadas em água destilada. Estas cepas foram fornecidas pelos pesquisadores Quindós e Pontón, da Universidade do País Basco (Espanha). Também foram

utilizados isolados provenientes de lesões de estomatite protética, obtidos em estudo de Crastechini et al. (2009) com aprovação do comitê de ética e pesquisa com seres humanos local sob o número de protocolo 070/2006-PH/CEP (ANEXO B). As amostras foram armazenadas em coleção (BHI + glicerol a 20%, congeladas a -20 °C), sendo 30 de *C. albicans*, 5 de *C. glabrata* e 3 de *C. tropicalis*).

Os microrganismos foram semeados em ágar Sabouraud Dextrose. Após 24 horas de incubação a 37 °C, os inóculos foram preparados em solução fisiológica estéril 0,9% na concentração  $10^6$  células/ml através de um espectrofotômetro. Foi utilizada a técnica da microdiluição em caldo: 100 µl dos extratos de *B. tomentosa* ressuspensos no meio de cultura RPMI 1640 (sem bicarbonato de sódio, com L-alanina, acrescido com 2% de glicose, tamponado em pH 6,5 com MOPS, esterilizado por filtração e 2 vezes concentrado) em uma concentração de 50 mg/ml, foram colocados na coluna 1 de uma placa com 96 poços.

Diluições seriadas de razão 2 dos extratos foram obtidas, a partir da concentração original do extrato, sendo que as concentrações obtidas nas colunas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 da placa de 96 poços (em mg/ml) foram 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,39 e 0,2. Depois de prontas as diluições, 50 µl dos inóculos foram pipetados nos poços. A CIM foi avaliada após 24 horas de incubação. Esta avaliação foi realizada através da semeadura de pequenas alíquotas das diluições e dos controles positivos em placas contendo ágar BHI. Após incubação 24 horas a 37 °C e depois foi observada, através do crescimento das colônias e comparação com os controles positivos, a menor concentração do extrato que foi capaz de inibir o crescimento fúngico (CIM) ou de eliminar as células (CFM). O controle positivo foi feito na coluna 12, onde foi pipetado 50 µl de RPMI (nas mesmas condições acima descritas) e 50 µl do inóculo.

#### 4.5 Caracterização química dos extratos mais ativos

Esta fase do estudo foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Marcos José Salvador, do Curso de Farmácia da Universidade Estadual de Campinas (IB/UNICAMP). Os extratos selecionados foram submetidos à espectrometria de massas por injeção direta por eletrospray (ESI-MS).

Esta técnica consiste espirrar para fora de uma pequena agulha, na qual uma alta voltagem é aplicada, a solução da amostra ionizada em pressão atmosférica e em um solvente apropriado. Esse processo produz pequenas gotículas carregadas, as quais têm solvente evaporado deixando a molécula a ser analisada na fase gasosa e ionizada. Depois, essas são “arrastadas” por um sistema acelerador de íons no espectrômetro de massa que está essencialmente no vácuo, e os íons são separados e detectados usando um analisador.

Essa análise pode ser por modo negativo, gerando moléculas não protonadas  $(M-H)^-$  ou por modo positivo, gerando moléculas protonadas  $(M+H)^+$ . No presente estudo, esta metodologia buscou realizar uma análise preliminar dos extratos de *Buchenavia tomentosa* (Combrateceae) numa tentativa de traçar seu perfil químico e visando realizar um estudo inicial de desreplicação de seus extratos, buscando-se verificar a possível presença de alguma substância já isolada de plantas da mesma família, gênero ou espécie.

Para tal, cerca de 1 mg das amostras foram solubilizados em 1 ml de metanol (S1). Em seguida, 100 µl de S1 foi diluído em 900 µl de uma solução metanol/água (1:1) acrescida de 0,1% de hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH), gerando uma primeira diluição (D1). Depois, 100 µl de D1 foi diluído em 900 µl de uma solução metanol/água (1:1) acrescida de 0,1% de hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH). Esta solução foi injetada diretamente no Espectrômetro de Massas Quadrupolar – Micromass, por

eletrospray, e a análise foi realizada em modo positivo e em modo negativo (Roesler et al., 2008).

Os constituintes foram identificados por comparação de seus pesos moleculares e espectros de fragmentação ESI-MS/MS com dados encontrados previamente na literatura científica (Tabela 10).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Teste de difusão em ágar (*Screening*)

A seleção dos extratos para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), foram considerados os parâmetros estabelecidos por Nascimento et al. (2000), no qual a presença de halos de inibição superiores a 7 mm sugere extratos com potencial atividade antimicrobiana.

Os resultados deste *screening* (tabela 2) demonstraram que os extratos aquosos B (5 minutos/100 °C), C (60 minutos/55 °C) e D (72 horas/temperatura ambiente) formaram halos de inibiçãomaiores que 7 mm para todas as cepas padrão estudadas, a partir da concentração de 50 mg/ml. Também ocorreu formação de halos de inibição maiores que 7 mm a partir dos extratos A (Etanol 70 °/temperatura ambiente/72 horas) e E (Etanol 99 °/temperatura ambiente/após maceração com hexano) para as cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 18804), *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. glabrata* (ATCC 90030), *C. krusei* (ATCC 6258) e *C. dubliniensis* (ATCC 778157).

Entretanto, para cepa padrão de *C. tropicalis* (ATCC 13803) os extratos A e E foram inativos. Em todos os extratos estudados, houve formação de halo total para a espécie *C. krusei* (tabela 2), sugerindo efeito fungicida. Para todas as outras espécies (exceto *C. tropicalis* no extrato B), os halos apresentaram microcolônias (tabela 2), sugerindo assim efeito fungistático.

Segundo os parâmetros adotados, os resultados do *screening* (tabela 2) sugeriram a seleção dos extratos B e C como os 2 extratos mais ativos para os testes posteriores.

Tabela 2 - Resultados (em milímetros) do teste do halo de inibição para obtenção dos dois extratos mais ativos de *Buchenavia tomentosa*

Tipo de extrato	<i>C. albicans</i> ATCC: 18804 †	<i>C. tropicalis</i> ATCC: 13803 †	<i>C. parapsilosis</i> ATCC: 22019 †	<i>C. glabrata</i> ATCC: 90030 †	<i>C. krusei</i> ATCC: 6258 ‡	<i>C. dubliniensis</i> ATCC: 778157 †
A	20	0	16	15	13	16
B	19	11 ‡	16	12	18	16
C	17	11	17	13	16	15
D	20	11	15	11	16	17
E	17	0	19	18	15	17

† Presença de microcolônias nos halos

‡ Halo total

A= Etanol 70 °/72 h/temperatura ambiente; B= água/5 min/100 °C; C= água/60 min/55 °C; D= água/72 h/temperatura ambiente; E= Etanol 99 °/72 h/temperatura ambiente/após maceração com hexano

Os resultados apresentados na tabela 2 estão ilustrados nas figuras 2, 3, 4, 5, 6 e 7, nas quais respectivamente, é possível observar os halos de inibição de *C. albicans* (ATCC 18804), *C. tropicalis* (ATCC 13803), *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. glabrata* (ATCC 90030), *C. dubliniensis* (ATCC 778157) e *C. krusei* (ATCC 6258) frente aos extratos A (etanol 70 °/72 horas/temperatura ambiente), B (água/5 minutos/100 °C), C (água/60 minutos/55 °C), D (água/72 horas/temperatura ambiente) e E (etanol 99 °/72 horas/temperatura ambiente/após maceração com hexano).

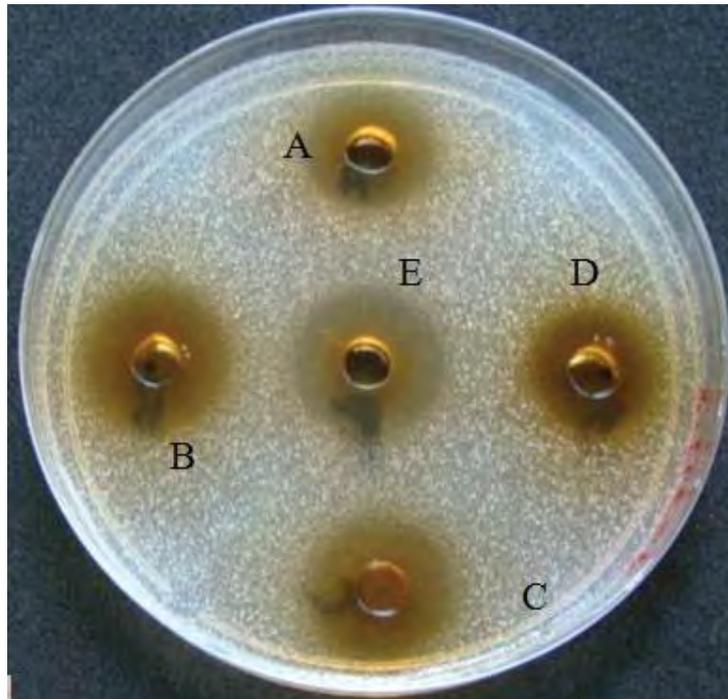


Figura 2 - *Screening* dos 2 extratos mais ativos de *Buchenavia tomentosa* para *Candida albicans* (ATCC: 18804); A= Etanol 70 °/72 horas/temperatura ambiente; B= água:5 minutos/100 °C; C= água:60 minutos/55 °C; D= água:72 horas/temperatura ambiente; E= Etanol 99 °/72 horas/temperatura ambiente/após maceração com hexano.



Figura 3 - *Screening* dos 2 extratos mais ativos de *Buchenavia tomentosa* para *Candida tropicalis* (ATCC 13804); A= Etanol 70 °/72 horas/temperatura ambiente; B= água:5 minutos/100 °C; C= água:60 minutos/55 °C; D= água:72 horas/temperatura ambiente; E= Etanol 99 °/72 horas/temperatura ambiente/após maceração com hexano.

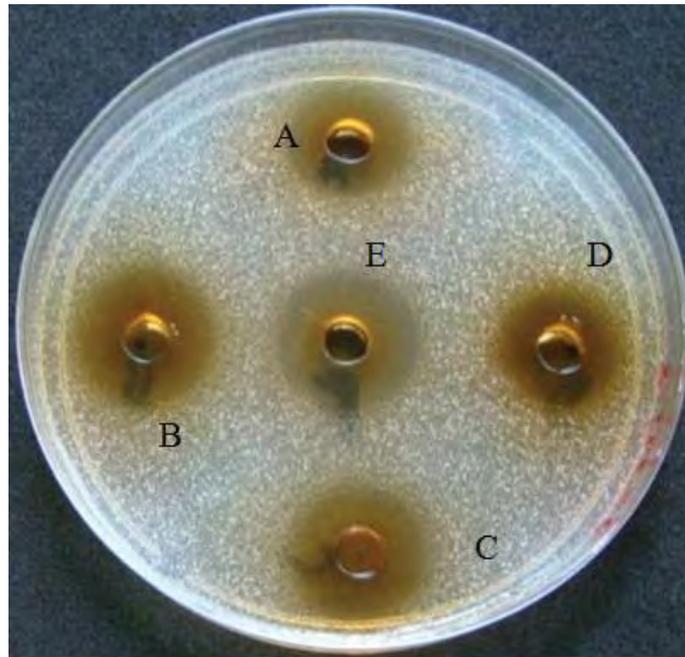


Figura 4 - Screening dos 2 extratos mais ativos de *Buchenavia tomentosa* para *Candida parapsilosis* (ATCC 22019); A= Etanol 70 °/72 horas/temperatura ambiente; B= água:5 minutos/100 °C; C= água:60 minutos/55 °C; D= água:72 horas/temperatura ambiente; E= Etanol 99 °/72 horas/temperatura ambiente/após maceração com hexano.

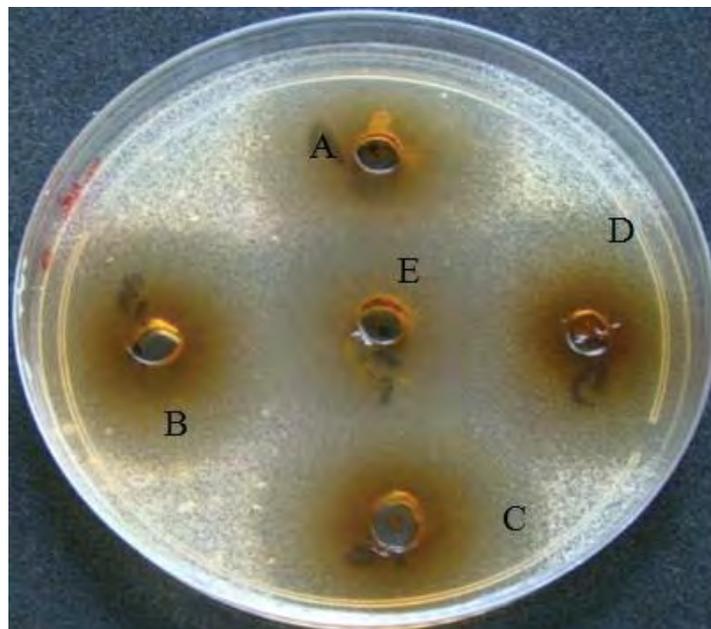


Figura 5 - Screening dos 2 extratos mais ativos de *Buchenavia tomentosa* para *Candida glabrata* (ATCC 90030); A= Etanol 70 °/72 horas/temperatura ambiente; B= água:5 minutos/100 °C; C= água:60 minutos/55 °C; D= água:72 horas/temperatura ambiente; E= Etanol 99 °/72 horas/temperatura ambiente/após maceração com hexano.

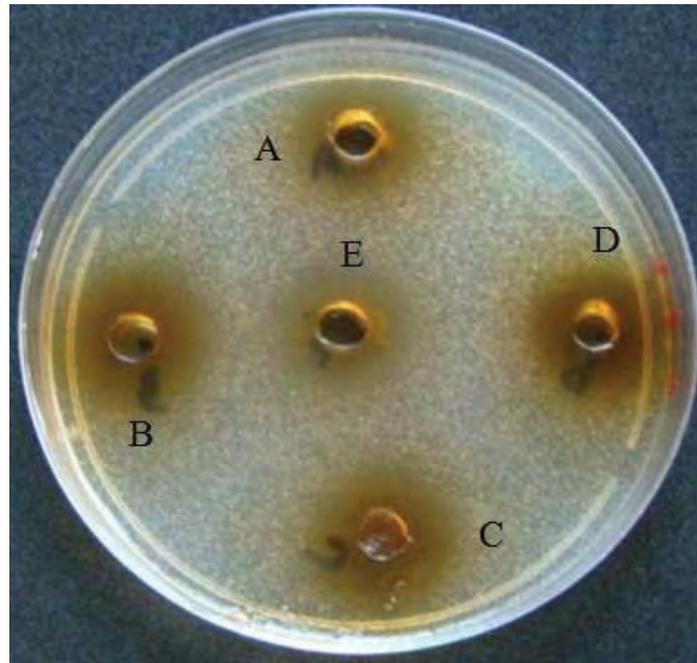


Figura 6 - *Screening* dos 2 extratos mais ativos de *Buchenavia tomentosa* para *Candida dubliniensis* (ATCC 778157); A= Etanol 70 °/72 horas/temperatura ambiente; B= água:5 minutos/100 °C; C= água:60 minutos/55 °C; D= água:72 horas/temperatura ambiente; E= Etanol 99 °/72 horas/temperatura ambiente/após maceração com hexano.

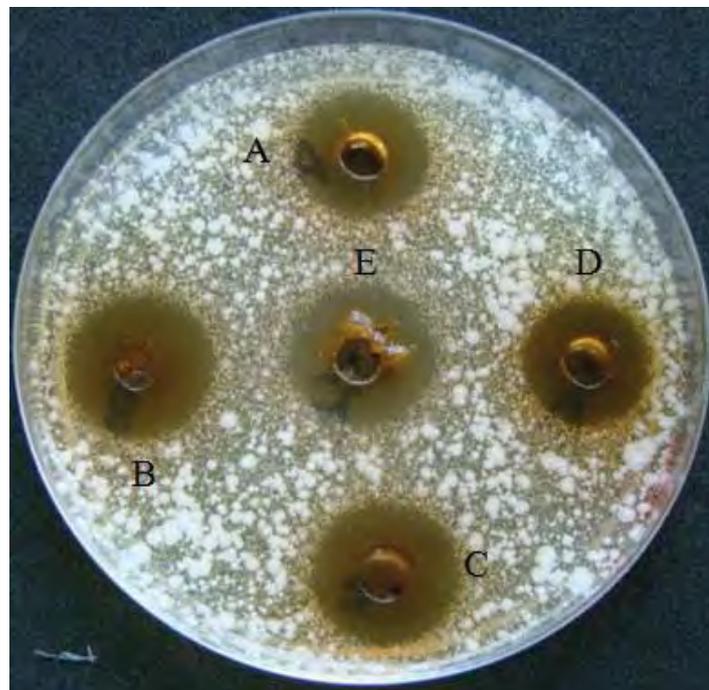


Figura 7 - *Screening* dos 2 extratos mais ativos de *Buchenavia tomentosa* para *Candida krusei* (ATCC 6258); A= Etanol 70 °/72 horas/temperatura ambiente; B= água:5 minutos/100 °C; C= água:60 minutos/55 °C; D= água:72 horas/temperatura ambiente; E= Etanol 99 °/72 horas/temperatura ambiente/após maceração com hexano.

## **5.2 Atividade antifúngica sobre cepas padrão e isolados clínicos - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração fungicida mínima (CFM) dos extratos mais ativos**

### 5.2.1 Resultados para cepas padrão de *Candida*

Para esses testes foram selecionados os extratos B e C, que apresentaram os melhores resultados no teste do halo de inibição. Os resultados das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) e das Concentrações Fungicidas Mínimas (CFMs), (tabela 3) demonstraram que os dois extratos apresentaram atividade antifúngica frente todas as cepas padrão estudadas.

Para a maioria das cepas, seu efeito foi fungistático, apresentando atividade fungicida apenas para *C. krusei* (ATCC 6258). As cepas de *C. glabrata* (ATCC 90030) e *C. dubliniensis* (ATCC 778157) foram as que se apresentaram mais sensíveis (menores valores de CIM) aos extratos e as cepas de *C. albicans* (ATCC 18804) e *C. tropicalis* (ATCC 13803) foram as que se apresentaram mais resistentes (maiores valores de CIM). Os valores das CIMs (tabela 3) variou de 0,2 a 12,5 mg/ml e os valores da CFM (tabela 3) para *C. krusei* (ATCC 6258) foi de 6,25 para o extrato B e 3,12 para o extrato C.

Tabela 3 - Valores (em mg/ml) das Concentrações Inibitórias Mínima (CIMs) e Concentrações Fungicidas Mínimas (CFMs) dos 2 extratos mais ativos de *Buchenavia tomentosa* observadas nas cepas padrão de *Candida* spp.

Espécie	ATCC	CIM	CIM	CFM	CFM
		Extrato B	Extrato C	Extrato B	Extrato C
<i>C. albicans</i>	18804	12,5	12,5	-	-
<i>C. tropicalis</i>	13803	12,5	12,5	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	22019	6,25	6,25	-	-
<i>C. glabrata</i>	90030	0,20	0,20	-	-
<i>C. dubliniensis</i>	778157	0,20	0,39	-	-
<i>C. krusei</i>	6258	0,78	0,78	6,25	3,12

- Não foi observado efeito fungicida; Extrato B= água:5 minutos/100 °C; Extrato C= água:60 minutos/55 °C.

Os resultados da tabela 3 estão ilustrados nas figuras 7 e 8.

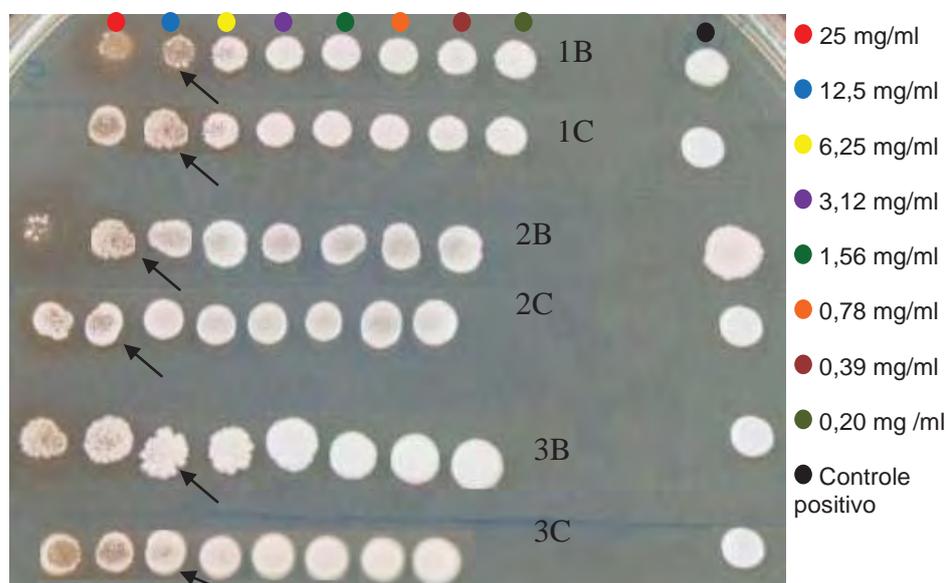


Figura 8 - Testes para determinação da Concentração Fungicida Mínima para as cepas padrão: 1- *C. albicans* (ATCC 18804); 2- *C. tropicalis* (ATCC 13803); *C. parapsilosis* (ATCC 22019); B: extrato B; C: extrato C; as setas representam as concentrações em que se observam as CIMs.

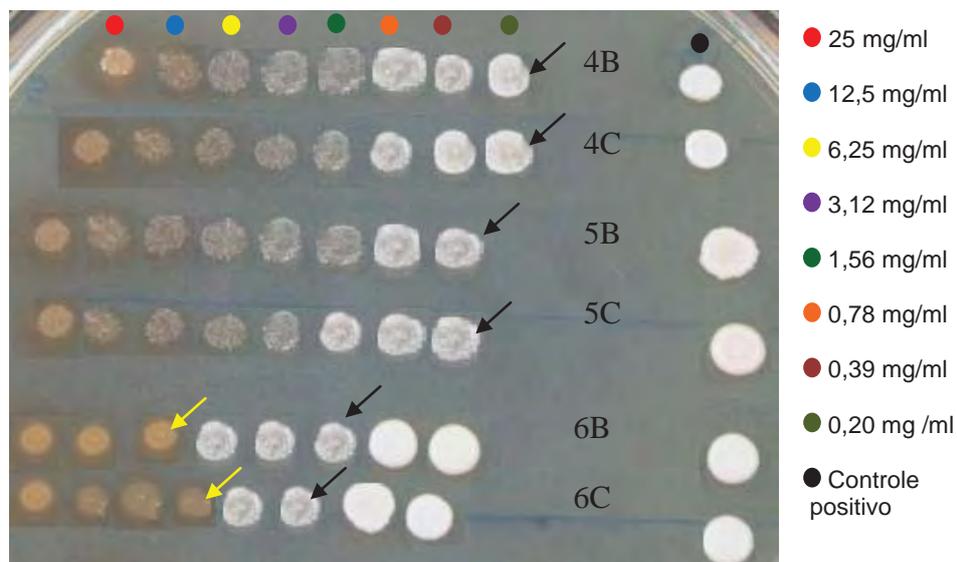


Figura 9 - Testes para determinação da Concentração Fungicida Mínima para as cepas padrão: 4- *C. glabrata* (ATCC 90030); 5- *C. dubliniensis* (ATCC 778157); 6- *C. krusei* (ATCC 6258); B: extrato B; C: extrato C; as setas pretas representam as concentrações em que se observam as CIMs; as setas amarelas representam as concentrações em que se observam as CFMs.

### 5.2.2 Resultados para isolados de origem hospitalar de *Candida* spp.

Após a seleção dos dois extratos mais ativos de *B. tomentosa*, foram também determinadas as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) e as Concentrações Fungicidas Mínimas (CFMs) para cepas de *Candida* isoladas de infecções sistêmicas (tabelas 4, 5, 6 e 7).

Para os isolados de *C. albicans* (Tabela 4), os dois extratos exerceram atividade fungistática sobre todas as cepas, sendo que para o extrato B, 40% (n=14) apresentaram a mesma CIM da cepa padrão (ATCC 18804) e para o extrato C, 51% (n=18) também apresentaram a CIM idêntica a mesma cepa padrão. Para 20 amostras (57%), as CIMs foram as mesmas para os dois extratos. O extrato B apresentou uma melhor efetividade, já que 9 amostras (26%) demonstraram os menores valores de CIMs. O extrato C foi mais efetivo em 6 amostras (17%) e as CIMs encontradas para estas amostras foram maiores do que quando o extrato B foi mais efetivo.

Tabela 4 - Valores (em mg/ml) das Concentrações Inibitórias Mínima (CIMs) e Concentrações Fungicidas Mínimas (CFMs) dos 2 extratos mais ativos de *Buchenavia tomentosa* observadas nos isolados hospitalares de *Candida albicans*

Amostra	Origem *	Extrato B		Extrato C	
		CIM	CFM	CIM	CFM
1	Ponta de cateter	12,5	-	12,5	-
3	Secreção fistular	6,25	-	12,5	-
8	Secreção de escara	12,5	-	25	-
11	Lavado gástrico	6,25	-	6,25	-
12	Sonda	6,25	-	12,5	-
13	Lavado gástrico	12,5	-	6,25	-
14	Ponta de sonda	25	-	12,5	-
15	Ponta de sonda	25	-	12,5	-
20	Ponta de sonda	12,5	-	12,5	-
23	Escarro	12,5	-	12,5	-
24	Secreção de ouvido	12,5	-	12,5	-
25	Ponta de sonda	12,5	-	12,5	-
27	Secreção orofaríngea	12,5	-	12,5	-
29	Hemocultura	12,5	-	6,25	-
30	Hemocultura	12,5	-	6,25	-
31	Hemocultura	12,5	-	12,5	-
34	Ponta de sonda	25	-	25	-
35	Hemocultura	25	-	25	-
46	Secreção traqueal	25	-	25	-
55	Secreção excrotal	25	-	25	-
56	Secreção orofaríngea	25	-	25	-
60	Secreção anal	1,56	-	1,56	-
61	Secreção orofaríngea	25	-	25	-
64	Secreção gástrica	25	-	25	-
65	Secreção orofaríngea	25	-	12,5	-
68	Ponta de intracath	25	-	25	-
69	Dreno inferior	12,5	-	12,5	-
70	Ponta de sonda vesical	3,12	-	12,5	-
72	Dreno superior	3,12	-	25	-
73	Dreno inferior	6,25	-	25	-
74	Ponta de sonda vesical	6,25	-	25	-
77	Ponta de sonda vesical	6,25	-	12,5	-
78	Hemocultura	12,5	-	12,5	-
85	Escarro	3,12	-	12,5	-

- Não foi observado efeito fungicida; Extrato B= água:5 minutos/100 °C; Extrato C= água:60 minutos/55 °C; \* Amostras isoladas no trabalho de Khouri (2010).

Os dois extratos exerceram atividade fungistática sobre todos os 19 isolados de *C.tropicalis*, sendo que para o extrato B, 11% (n=2) apresentaram a mesma CIM da cepa padrão e para o extrato C, 53% (n=10) também apresentaram a mesma CIM da cepa padrão (tabela 5). Para 4 amostras (21%), as CIMs foram as mesmas para os dois extratos. O extrato B apresentou melhor efetividade, já que para 13

amostras (68%) menores CIMs foram observadas. O extrato C foi mais efetivo que o B para apenas 2 amostras (11%). O extrato B apresentou atividade fungicida para as amostras 5, 6, 37 e 41, cujos valores de CFM (em mg/ml) foram, respectivamente, 6,25, 12,5, 6,25 e 12,5 (tabela 5).

Tabela 5 - Valores (em mg/ml) das Concentrações Inibitórias Mínima (CIMs) e Concentrações Fungicidas Mínimas (CFMs) dos 2 extratos mais ativos de *Buchenavia tomentosa* observadas nos isolados hospitalares de *Candida tropicalis*

Amostra	Origem *	Extrato B		Extrato C	
		CIM	CFM	CIM	CFM
5	Ponta de sonda	3,12	6,25	6,25	-
6	Ponta de sonda	6,25	12,5	12,5	-
9	Secreção de escara	3,12	-	3,12	-
33	Secreção traqueal	6,25	-	1,56	-
37	Ponta de sonda vesical	3,12	6,25	1,56	-
41	Secreção traqueal	3,12	12,5	6,25	-
45	Úlcera	12,5	-	12,5	-
47	Secreção traqueal	3,12	-	6,25	-
48	Secreção traqueal	3,12	-	6,25	-
50	Ponta de intracath	12,5	-	12,5	-
51	Sonda vesical	3,12	-	12,5	-
54	Secreção traqueal	1,56	-	12,5	-
58	Secreção peniana	1,56	-	1,56	-
62	Sonda vesical	3,12	-	6,25	-
66	Ponta de sonda	6,25	-	12,5	-
67	Ponta de sonda vesical	3,12	-	12,5	-
71	Ponta de sonda vesical	6,25	-	12,5	-
81	Secreção de úlcera	3,12	-	12,5	-
82	Ponta de sonda vesical	3,12	-	12,5	-

- Não foi observado efeito fungicida; Extrato B= água:5 minutos/100 °C; Extrato C= água:60 minutos/55 °C; \* Amostras isoladas no trabalho de Khouri (2010).

Para as 20 cepas de *C. parapsilosis* (Tabela 6), os dois extratos exerceram atividade fungistática sobre todas as cepas, sendo que para o extrato B, 15% (n=3) apresentaram a mesma CIM da cepa padrão (ATCC 22019) e para o extrato C, 15% (n=3) também apresentaram a CIM idêntica a mesma. Para 10 amostras (50%), as CIMs foram similares para os dois extratos. O extrato B apresentou uma melhor efetividade, já que 6 amostras (30%) apresentaram menores valores de CIMs. O extrato C foi mais efetivo que o B para 3 amostras (15%).

Tabela 6 - Valores (em mg/ml) das Concentrações Inibitórias Mínima (CIMs) e Concentrações Fungicidas Mínimas (CFMs) dos 2 extratos mais ativos de *Buchenavia tomentosa* observadas nos isolados hospitalares de *Candida parapsilosis*

Amostra	Origem *	Extrato B		Extrato C	
		CIM	CFM	CIM	CFM
2	Ponta de cateter	1,56	-	1,56	-
4	Secreção maxilar	3,12	-	3,12	-
7	Secreção traqueal	6,25	-	12,5	-
10	Secreção de cateter	3,12	-	12,5	-
22	Hemocultura	12,5	-	6,25	-
26	Hemocultura	0,2	-	0,2	-
38	Secreção traqueal	3,12	-	1,56	-
42	Hemocultura	0,39	-	0,78	-
44	Secreção abdominal	3,12	-	3,12	-
49	Ponta de intracath	0,78	-	0,78	-
52	Sonda vesical	3,12	-	3,12	-
53	Ponta de intracath	1,56	-	3,12	-
59	Secreção no tornozelo	6,25	-	6,25	-
80	Ponta de cateter	6,25	-	6,25	-
89	Secreção traqueal	3,12	-	3,12	-
90	Sangue	1,56	-	1,56	-
93	Secreção	3,12	-	3,12	-
98	Sangue	0,2	-	0,39	-
99	Secreção no pé	3,12	-	1,56	-
100	Secreção abdominal	1,56	-	3,12	-

- Não foi observado efeito fungicida; Extrato B= água:5 minutos/100 °C; Extrato C= água:60 minutos/55 °C; \* Amostras isoladas no trabalho de Khouri (2010).

As 8 cepas de *C. glabrata* (tabela 7), ao contrário das demais cepas estudadas, foram mais sensíveis ao extrato C, já que 4 das 8 amostras (50%) apresentaram CIMs menores quando comparados ao extrato B. Nas outras 4 cepas, 2 foram mais sensíveis ao extrato B (25%) e 2 (25%) apresentaram CIMs iguais. Todas as cepas de *C. glabrata* isoladas de origem hospitalar apresentaram CIMs maiores do que a cepa padrão.

Para as 5 cepas de *C. dubliniensis* (tabela 7), 1 cepa (20%) apresentou-se mais sensível para o extrato C. Em 2 cepas (40%), o extrato B foi o mais efetivo e nas outras 2 (40%), as CIMs foram as mesmas. As 5 cepas de *C. dubliniensis* demonstraram CIMs para maiores do que a cepa padrão para ambos extratos.

Para a amostra de *C. krusei* (tabela 7) os resultados das CIMs das CFMs foram idênticos para os dois extratos. As CIMs

encontradas foram maiores do que a cepa padrão (tabela 3) e a CFM obtida a partir da cepa de infecção sistêmica foi menor para o extrato B e igual para o extrato C em relação à cepa padrão (tabela 3).

Tabela 7 - Valores (em mg/ml) das Concentrações Inibitórias Mínima (CIMs) e Concentrações Fungicidas Mínimas (CFMs) dos 2 extratos mais ativos de *Buchenavia tomentosa* observadas nos isolados hospitalares de *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis* e *Candida krusei*

Amostra	Origem	Espécie	Extrato B		Extrato C	
			CIM	CFM	CIM	CFM
16	Ponta de cateter*	<i>C. glabrata</i>	1,56	-	0,39	-
32	Secreção maxilar*	<i>C. glabrata</i>	0,78	-	1,56	-
36	Secreção traqueal*	<i>C. glabrata</i>	0,78	-	0,39	-
40	Secreção de cateter*	<i>C. glabrata</i>	1,56	-	1,56	-
43	Hemocultura*	<i>C. glabrata</i>	0,78	-	1,56	-
63	Hemocultura*	<i>C. glabrata</i>	6,25	-	6,25	-
79	Secreção traqueal*	<i>C. glabrata</i>	0,78	-	0,39	-
96	Hemocultura*	<i>C. glabrata</i>	1,56	-	0,39	-
88	Ponta de cateter*	<i>C. krusei</i>	1,56	3,12	1,56	3,12
99208	Candidose orofaríngea**	<i>C. dubliniensis</i>	6,25	-	3,12	-
99209	Candidose orofaríngea**	<i>C. dubliniensis</i>	0,39	-	0,78	-
132	Candidose orofaríngea**	<i>C. dubliniensis</i>	6,25	-	12,5	-
134	Candidose orofaríngea**	<i>C. dubliniensis</i>	0,39	-	0,39	-
135	Candidose orofaríngea**	<i>C. dubliniensis</i>	3,12	-	3,12	-

- Não foi observado efeito fungicida; Extrato B= água:5 minutos/100 °C; Extrato C= água:60 minutos/55 °C; \* Amostras isoladas no trabalho de Khouri (2010); \*\* Amostras fornecidas pelos pesquisadores Quindós e Pontón da Universidade do País Basco (Espanha).

### 5.2.3 Resultados para cepas isoladas de lesões de candidose eritematosa

Para as 30 cepas de *C. albicans* isoladas de lesões de candidose eritematosa (Tabela 8), os dois extratos exerceram atividade fungistática sobre todas as cepas, sendo que para o extrato B, 30% (n=9) apresentaram a mesma CIM da cepa padrão (ATCC 18804) e para o extrato C, 33% (n=10) também apresentaram a CIM idêntica a mesma cepa padrão. Para 17 amostras (57%), as CIMs foram as mesmas para os dois extratos. O extrato B apresentou uma melhor efetividade, já que para 9 amostras (30%) as CIMs foram menores do que ao extrato C, e as menores CIMs encontradas foram a partir deste. O extrato C foi mais

efetivo em 4 amostras (13%) e as CIMs encontradas para estas amostras foram maiores do que quando o extrato B foi mais efetivo.

Tabela 8 - Valores (em mg/ml) das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) e Concentrações Fungicidas Mínimas (CFMs) dos 2 extratos mais ativos de *Buchenavia tomentosa* observadas nas cepas de *Candida albicans* isoladas de lesões de candidose eritematosa

Amostra	Origem *	Extrato B		Extrato C	
		CIM	CFM	CIM	CFM
P01	candidose eritematosa	0,78	-	6,25	-
P02	candidose eritematosa	1,56	-	3,12	-
P04	candidose eritematosa	12,5	-	12,5	-
P06	candidose eritematosa	12,5	-	12,5	-
P07	candidose eritematosa	12,5	-	12,5	-
P08	candidose eritematosa	6,25	-	12,5	-
P09	candidose eritematosa	12,5	-	12,5	-
P11	candidose eritematosa	1,56	-	6,25	-
P13	candidose eritematosa	6,25	-	6,25	-
P14	candidose eritematosa	12,5	-	12,5	-
P15	candidose eritematosa	6,25	-	6,25	-
P18	candidose eritematosa	3,12	-	3,12	-
P21	candidose eritematosa	6,25	-	6,25	-
P22	candidose eritematosa	12,5	-	12,5	-
P24	candidose eritematosa	0,78	-	6,25	-
P27	candidose eritematosa	12,5	-	12,5	-
P28	candidose eritematosa	3,12	-	6,25	-
P29	candidose eritematosa	3,12	-	6,25	-
P30	candidose eritematosa	6,25	-	3,12	-
P31	candidose eritematosa	6,25	-	6,25	-
P32	candidose eritematosa	12,5	-	12,5	-
P38	candidose eritematosa	6,25	-	6,25	-
P42	candidose eritematosa	12,5	-	12,5	-
P43	candidose eritematosa	3,12	-	6,25	-
P44	candidose eritematosa	6,25	-	3,12	-
P45	candidose eritematosa	0,78	-	6,25	-
P46	candidose eritematosa	6,25	-	6,25	-
P47	candidose eritematosa	3,12	-	1,56	-
P48	candidose eritematosa	6,25	-	6,25	-
P51	candidose eritematosa	6,25	-	6,25	-

- Não foi observado efeito fungicida; Extrato B= água:5 minutos/100 °C; Extrato C= água:60 minutos/55 °C; \* Amostras isoladas no trabalho de Crastechini et al (2009).

Os resultados mais uma vez demonstram uma melhor atividade do extrato C frente a *C. glabrata* (tabela 9), neste caso isoladas de lesões de candidose eritematosa, uma vez que 4 (80%) das 5 amostras apresentaram maior sensibilidade para este extrato. Para amostra restante (20%), os valores das CIMs foram os mesmos para

ambos os extratos. Apenas uma amostra (Cg 33) obteve o mesmo valor de CIM da amostra padrão (tabela 3). Todas as demais apresentaram CIMs maiores do que a cepa padrão de *C. glabrata* ATCC 90030 (tabela 3).

As 3 amostras de *C. tropicalis* isoladas de lesões de candidose eritematosa (tabela 9) apresentaram CIMs menores do que a cepa padrão ATCC 18803 (tabela 3). Para esses isolados, os valores de CIM encontrados foram idênticos, sendo que em todas as amostras, o extrato B foi mais efetivo do que extrato C.

Tabela 9 - Valores (em mg/ml) das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) e Concentrações Fungicidas Mínimas (CFMs) dos 2 extratos mais ativos de *Buchenavia tomentosa* observadas nas cepas de *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* isoladas de lesões de candidose eritematosa

Amostra	Origem	Espécie	Extrato B		Extrato C	
			CIM	CFM	CIM	CFM
Cg 27	cand. erit.	<i>C. glabrata</i>	1,56	-	0,78	-
Cg 33	cand. erit.	<i>C. glabrata</i>	0,2	-	0,2	-
Cg 34	cand. erit.	<i>C. glabrata</i>	0,78	-	0,2	-
Cg 39	cand. erit.	<i>C. glabrata</i>	1,56	-	0,78	-
Cg 50	cand. erit.	<i>C. glabrata</i>	1,56	-	0,39	-
Ct 33	cand. erit.	<i>C. tropicalis</i>	3,12	-	6,25	-
Ct 35	cand. erit.	<i>C. tropicalis</i>	3,12	-	6,25	-
Ct 49	cand. erit.	<i>C. tropicalis</i>	3,12	-	6,25	-

- Não foi observado efeito fungicida; cand. erit.: candidose eritematosa; Extrato B= água:5 minutos/100 °C; Extrato C= água:60 minutos/55 °C; \* Amostras isoladas no trabalho de Crastechini et al. (2009).

Para melhor caracterizar os resultados, serão incluídos na tabela 10, os valores de CIM, para as amostras com os maiores números de cepas, efetivos para cerca de 50% as amostras (CIM<sub>50</sub>) e para cerca de 90% das amostras (CIM<sub>90</sub>). Estes dados, que já estão bem estabelecidos para os antifúngicos convencionais, ajudam a elucidar pontos de corte dos valores de CIM para possíveis dosagens terapêuticas

Tabela 10 - Valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> (em mg/ml) para as cepas de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*

Espécie	Origem	Extrato B		Extrato C	
		CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>
<i>C. albicans</i>	hospitalar	12,5	25	12,5	25
<i>C. albicans</i>	cand. erit.	6,25	12,5	6,25	12,5
<i>C. tropicalis</i>	hospitalar.	3,12	6,25	6,25	12,5
<i>C. parapsilosis</i>	hospitalar	3,12	6,25	3,12	6,25

cand. erit.: candidose bucal eritematosa

### 5.3 Caracterização química dos extratos mais ativos

Após realização de espectrometria de massas por injeção direta (ESI-MS), seguida de análise MS/MS, a partir de uma extração aquosa de folhas de *Buchenavia tomentosa* (Combretaceae), foram encontradas moléculas com pesos moleculares semelhantes a diversas substâncias bioativas previamente descritas na literatura (tabela 11), sendo sugeridos a presença de terpenóides, ácidos fenólicos, flavonóides e taninos nas amostras estudadas. A maioria dessas substâncias já foi isolada em espécies da família Combretaceae, incluindo os gêneros *Combretum*, *Terminalia* e *Buchenavia* (tabela 11).

Nos extratos analisados neste trabalho, os compostos ácido gálico, kaempferol, eschweilenol B e corilagina (tabela 11) foram apenas encontradas no extrato B (água: 5 minutos/100 °C) e tiveram suas moléculas ionizadas apenas em modo negativo (M-H)<sup>-</sup>. As substâncias eschweilenol C, vitexina e 1 $\alpha$ ,23 $\beta$ -dihidroxi-12-oleaneno-29-ácido-oico-23 $\beta$ -O- $\alpha$ -L-4-acetilramnopiranosida (tabela 11) foram encontradas nos dois extratos e também tiveram suas moléculas ionizadas apenas quando utilizado o modo negativo (M-H)<sup>-</sup>. A substância buchenavianina também só foi encontrada no extrato B (tabela 11) e teve suas moléculas ionizadas apenas quando se utilizou o modo positivo (M+H)<sup>+</sup>. A substância combregenina foi a única apenas encontrada no extrato C

(água: 60 minutos/55 °C) e suas moléculas só ionizaram apenas quando utilizou-se o modo positivo (M+H)<sup>+</sup>.

A análise no espectrômetro de massas tanto no modo positivo (M+H)<sup>+</sup> quanto no modo negativo (M-H)<sup>-</sup>, geram gráficos onde se observa através de picos, o peso molecular dos componentes presentes na amostra que, confrontados com os dados já disponíveis na literatura, sugerem a presença das substâncias.

Através dos gráficos gerados pelas análises (M-H)<sup>-</sup> e (M+H)<sup>+</sup> do extrato B (figuras 9 e 10 respectivamente) e do extrato C (figuras 11 e 12 respectivamente), pôde-se sugerir a presença das substâncias listadas na tabela 11.

Tabela 11 - Substâncias bioativas encontradas nos extratos águas B (5 minutos/100 °C) e C (60 minutos/55 °C) de *Buchenavia tomentosa*

Peso molecular teórico	(M+H) <sup>+</sup>	(M-H) <sup>-</sup>	Identidade	Fórm.mol.	EB	EC
70	-	169	<b>Ácido gálico</b> (*Batista et al., 2010)	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	+	-
285	-	285	<b>Kaempferol</b> (*Martini et al., 2004)	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	+	-
365	366	-	<b>Buchenavianina</b> (*Ahond et al., 1984)	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>11</sub>	+	-
423	-	423	<b>Eschweilenol B</b> (*Yang et al., 1998)	C <sub>20</sub> H <sub>8</sub> O <sub>11</sub>	+	-
432	-	431	<b>Vitexina</b> (*Adnyana et al., 2000)	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	+	+
447	-	447	<b>Eschweilenol C</b> (*Li XC et al., 2002)	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>12</sub>	+	+
521	521	-	<b>Combregenina</b> (*Jossang et al., 1996)	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>7</sub>	-	+
636	-	635	<b>Corilagina</b> (*Batista et al., 2010)	C <sub>27</sub> H <sub>24</sub> O <sub>18</sub>	+	-
675	-	675	<b>1<math>\alpha</math>,23<math>\beta</math>-dihidroxi-12-oleaneno-29-ácido-oico-23<math>\beta</math>-O-<math>\alpha</math>-L-4-acetilramnopiranosida</b> (*Angeh et al., 2007a)	C <sub>38</sub> H <sub>60</sub> O <sub>10</sub>	+	+

Fórm.mol.: Fórmula molecular; EB= Extrato B; EC= Extrato C \* Trabalhos utilizados como referência para sugestão da presença das substâncias encontradas em EB e EC de *Buchenavia tomentosa*.



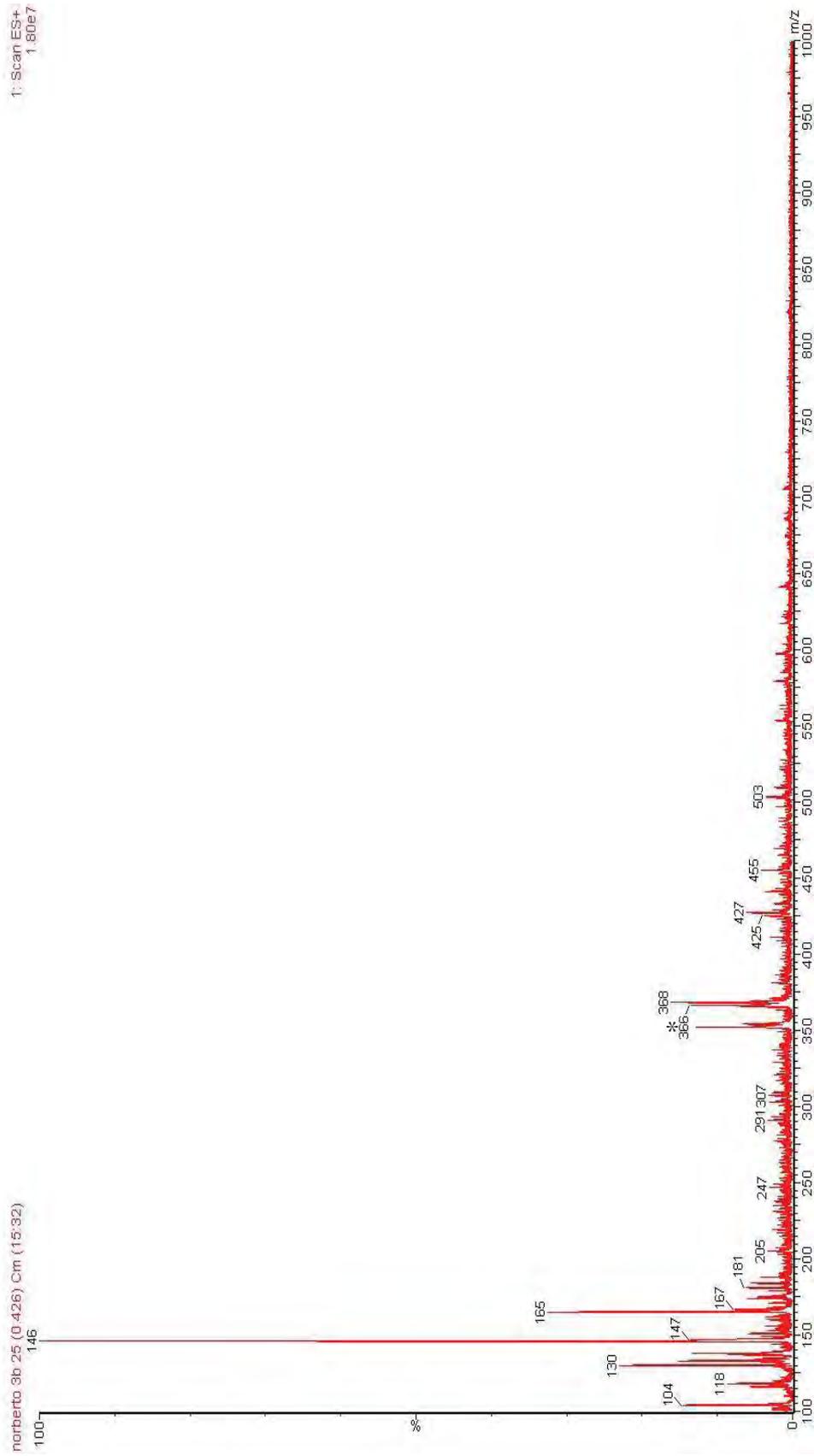


Figura 11 - Espectrometria de massas por injeção direta (M+H)<sup>+</sup> do extrato B (água: 5 minutos/100 °C) de *Buchenavia tomentosa*; \*buchenavianina.

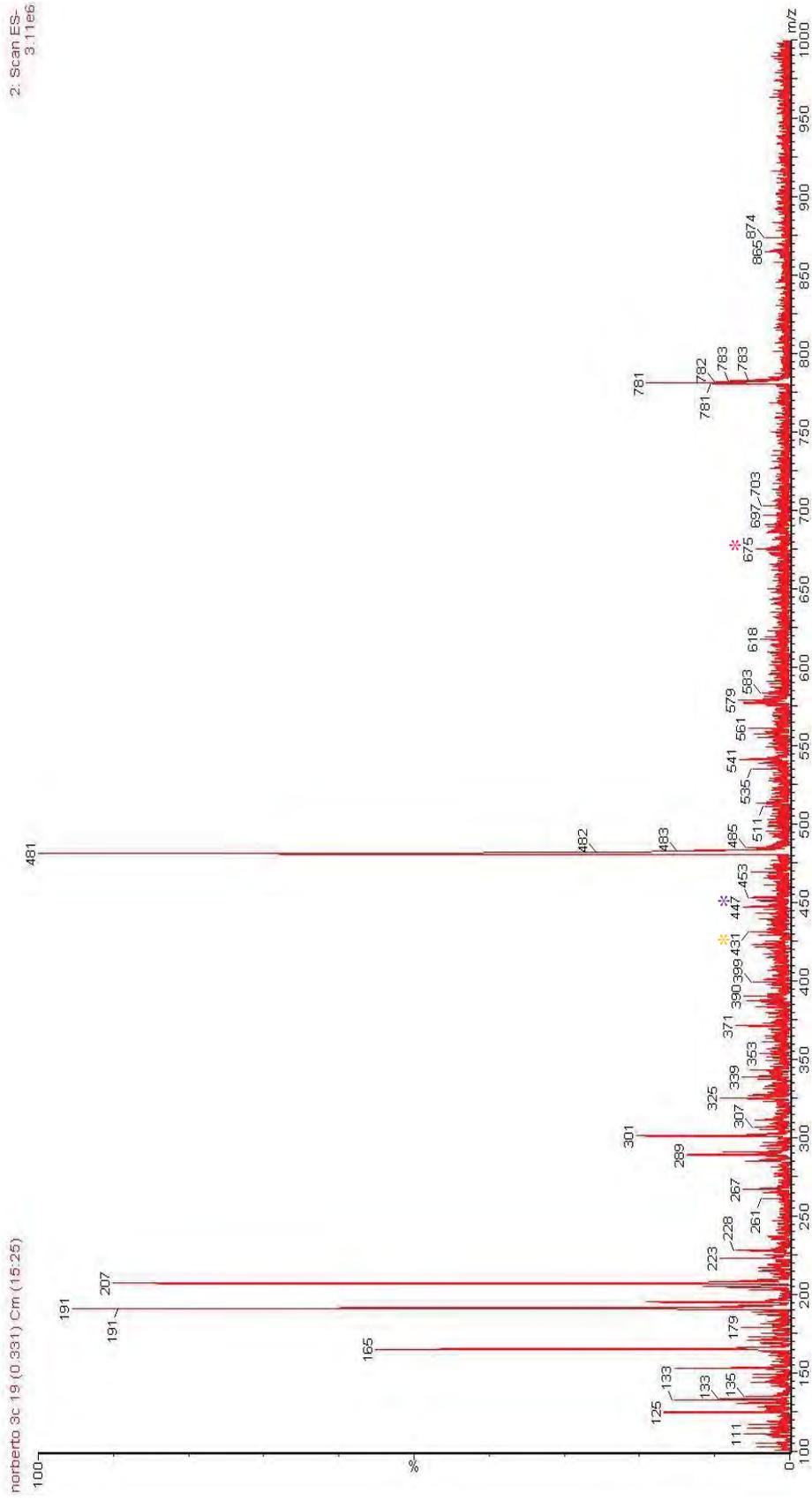


Figura 12 - Espectrometria de massas por injeção direta (M-H) do extrato C (água: 60 minutos/55 °C) de *Buchenavia tomentosa* \*vitexina; \*eschweilenol C; \* 1 $\alpha$ ,23 $\beta$ -dihidroxi-12-oleaneno-29-ácido-oico-23 $\beta$ -O- $\alpha$ -L-4-acetilramnopiranosida.

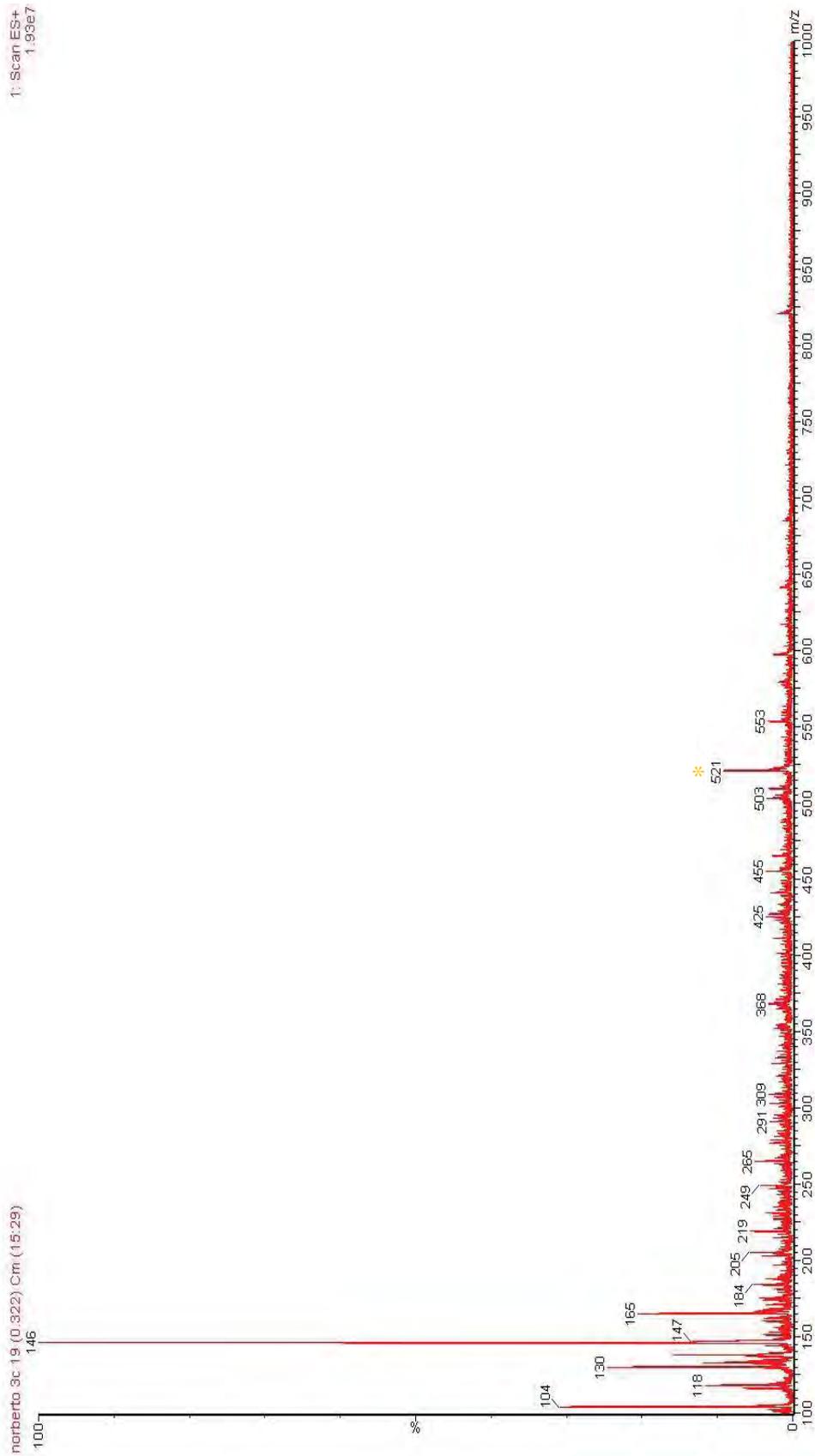


Figura 13 - Espectrometria de massas por injeção direta (M+H)<sup>+</sup> do extrato C (água: 60 minutos/55 °C) de *Buchenavia tomentosa*; \*combrigenina.

## 6 DISCUSSÃO

As amostras hospitalares de *Candida* spp. utilizadas neste estudo, foram isoladas no trabalho de Khouri (2010), onde as espécies mais prevalentes foram respectivamente, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*.

Os resultados do estudo de Khouri (2010) demonstrou *C. albicans* como espécie mais frequente em isolados de infecções nosocomiais, concordando com Colombo et al. (2003), que relata esta espécie como a espécie de mais frequentemente isolada de infecções sistêmicas. Khouri (2010) também encontrou em seu estudo *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, respectivamente, como segunda e terceira espécies de *Candida* mais prevalentes. Estes dados estão de acordo com diversos trabalhos, que relatam que apesar de *C. albicans* ainda ser a espécie mais isolada de diversos tipos de candidose, espécies de *Candida* não-*albicans* têm sido comumente identificadas e a prevalência dessas espécies em infecções humanas está mudando nos últimos anos. Estes estudos mostram que *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* vêm se destacando como segunda ou terceira espécies mais prevalentes nas infecções causadas por *Candida* (Silva et al., 2009; Weinberger et al., 2005; Nucci, Colombo, 2007; Saiman et al., 2001; Stoll et al., 2002; Fridkin et al., 2006).

As amostras de *C. glabrata* isoladas por Khouri (2010) ocuparam o quarto lugar como espécie mais prevalente. Estudos anteriores relataram que esta espécie ocupou o terceiro e até o segundo lugar como causa de infecção hospitalar (Pfaller, 1996; Sanguinetti et al., 2005; Pfaller et al., 2010).

As amostras de *Candida* spp. isoladas de lesões de candidoses bucais eritematosas utilizadas neste estudo, foram isoladas no trabalho de Castrequini et al. (2009). A levedura *C. albicans* é a mais frequentemente isolada de lesões de candidose oral eritematosa (Figueiral et al., 2007), concordando com Crastechini et al. (2009) que também observou em seus isolados de lesões de candidose eritematosa, maior prevalência de *C. albicans*. Os isolados de leveduras de Crastechini et al. (2009) mostraram *C. glabrata* e *C. tropicalis* respectivamente como segunda e terceira espécies mais frequentemente isoladas concordando com estudos que relatam importância destas espécies com desenvolvimento de candidose eritematosa (Figueiral et al., 2007; Song et al., 2009; Brevis et al., 2008).

Os resultados observados no presente estudo estão de acordo com estudos anteriores que avaliaram efeitos antifúngicos de plantas da família Combretaceae, mesma família de *B. tomentosa*. Baba-Moussa et al. (1999) verificaram ação antifúngica de plantas desta família. Os resultados do presente estudo demonstraram que os extratos aquosos B (5 minutos/100 °C) e C (60 minutos/55 °C) de *Buchenavia tomentosa* tiveram efeito antifúngico em todas as cepas estudadas. Estes resultados corroboram com os estudos de Masoko et al. (2005) e Masoko et al. (2007), que observaram efeito antifúngico tanto sobre leveduras (*Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*) quanto em fungos filamentosos (*Aspergillus fumigatus*, *Microsporum canis* e *Sporothrix schenckii*) em diversos tipos de extrato de folhas de plantas das espécies *Terminalia* spp. e *Combretum* spp. (Combretaceae).

Batista et al. (2010), comprovaram ação antifúngica contra as leveduras *C. albicans* (ATCC 90028), *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. glabrata* (ATCC 9030), *C. krusei* (ATCC 6258) e *C. neoformans* (ATCC 32045) a partir de extrato etanólico dos frutos de *B. tomentosa*. Contudo, ainda não foi registrado na literatura nenhum estudo comprovando

qualquer tipo de ação biológica, inclusive antifúngica, de extratos das folhas de *B. tomentosa*.

Além disso, o presente estudo mostrou que os extratos com melhor poder antifúngico foram os extratos aquosos, o que discorda dos estudos de Masoko et al. (2005) e Masoko et al. (2007), onde todos os extratos utilizados foram solventes orgânicos como acetona, hexano, diclorometano e metano. Adicionalmente, também não concordam com o estudo de Batista et al. (2010), que utilizou apenas etanol para obtenção do extrato. A eficiência antifúngica dos extratos aquosos de *B. tomentosa* encontrada neste trabalho aumentam sua relevância, uma vez que a obtenção destes extratos é mais fácil e menos dispendiosa.

As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) encontradas no presente estudo variaram entre 25 e 0,2 mg/ml para todas as espécies de *Candida*. Masoko et al. (2005) observaram no seu trabalho de investigação do poder antifúngico de 6 diferentes espécies de *Terminalia* spp., que as CIMs para *C. albicans*, variaram entre 0,08 a 0,64 mg/ml. Além disso, Masoko et al. (2007) observaram em *screening* da ação antifúngica de 24 espécies de *Combretum*, que as CIMs para *C. albicans* variaram entre 0,02 até 2.5 mg/ml. O presente estudo apresentou CIMs semelhantes a partir do extrato B para *C. albicans*, apenas em uma amostra de origem hospitalar e em 5 amostras isoladas de candidose oral eritematosa. Para o extrato C, apenas 1 amostra de origem hospitalar (tabela 4). Esta diferença entre CIMs pode ter ocorrido porque o presente estudo trabalhou com cepas potencialmente mais resistentes por se tratarem de isolados de ambiente hospitalar, diferente dos estudos de Masoko et al. (2005 e 2007) que utilizaram apenas uma amostra de *C. albicans*, além de trabalharem com tipos de extrações diferentes.

Baba-Moussa et al. (1999) encontraram CIMs de extratos hidroalcoólicos de diversas partes de plantas do gênero *Combretum*, *Terminalia* e *Pteleopsis* (Combretaceae) variando entre 1 e 4 mg/ml para *C. albicans*. O presente estudo apresentou CIMs semelhantes ao estudo

de Baba-Moussa et al. (1999) a partir do extrato B para *C. albicans*, em 4 amostras isoladas de infecções sistêmicas e em 10 amostras isoladas de candidose eritematosa. Para o extrato C, apenas 1 amostra isolada de infecções sistêmicas e 10 amostras isoladas de candidose eritematosa. Também neste caso, as diferenças entre as CIMs podem ter sido no número de amostras estudadas e na diferença dos métodos de extração.

O presente estudo relata valores de CIMs a partir de extratos brutos de *B. tomentosa* para espécies de *Candida* não-*albicans*. Os estudos de Batista et al. (2010) e Latte e Kolodziej (2000) também relatam valores de CIMs para espécies não-*albicans*, porém as CIMs são dadas a partir de componentes isolados dos extratos. Não foi encontrado na literatura estudos relatando ação antifúngica de extratos brutos de nenhum gênero da família Combretaceae, inclusive o gênero *Buchenavia*, sobre espécies de *Candida* não-*albicans*.

A sugestão da presença de alguns componentes bioativos, como o ácido gálico, kaempferol e corilagina, através da técnica de espectrometria de massa por injeção direta (ESI-MS), podem estar relacionadas à atividade antifúngica dos extratos de *B. tomentosa* verificada neste trabalho, principalmente no que se refere à melhor eficiência do extrato B (água:5 minutos/100 °C). Estes compostos foram detectados apenas neste extrato. A presença de ácido gálico, um importante tanino do grupo dos ácidos fenólicos, já foi observada também nos frutos de *B. tomentosa* (Batista et al., 2010). Além disso, o efeito antifúngico do ácido gálico tem sido relatado contra fungos filamentosos do gênero *Fusarium* e *Alternaria* (Shukla et al., 1999) e também para leveduras como *Sacharomyces cerevisiae* (Fujita, Kubo, 2002) e *Cryptococcus neoformans* (Batista et al., 2010; Latte, Kolodziej, 2000).

Para leveduras do gênero *Candida*, sua ação tem sido mais eficiente para as espécies *C. glabrata* e *C. krusei* (Batista et al., 2010; Latte, Kolodziej, 2000). Assim, pode-se sugerir que a eficiência do extrato B utilizado neste trabalho contra *C. krusei* pode estar relacionada

à presença do ácido gálico, já que para *C. glabrata*, o extrato C apresentou-se mais eficiente.

O kaempferol, também detectado no extrato B, é um importante polifenol do grupo dos flavonóide descrito na literatura com poder antibacteriano, antioxidante, antiinflamatório e protetor contra doenças cardiovasculares (Lim et al., 2007; Wang et al., 2006; Kim SY et al., 2005). Sua presença neste extrato pode também estar relacionada à sua ação antifúngica, uma vez que Salvador et al. (2004) encontraram ação antifúngica deste para *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. Além disso, tal substância tem sido relatada como importante componente que age nos fatores de virulência de fungos como na inibição da síntese de melanina em *Curvularia lunata* (Brunskole et al., 2009) e de quitina em *Saccharomyces cerevisiae* (Hwang et al., 2001). A atividade de kaempferol como importante inibidor da expressão in vitro de lipases e proteases por *C. albicans*, assim como no aumento da sobrevivência de animais submetidos à candidoses sistêmicas e diminuição de lesões de candidoses cutâneas foi descrita anteriormente (Yordanov et al., 2008).

A corilagina, uma molécula do grupo dos taninos também já foi detectada em frutos de *B. tomentosa* (Batista et al., 2010), tendo seu poder antifúngico previamente descrito na literatura sobre leveduras do gênero *Candida* e *C. neoformans* (Batista et al., 2010; Latte, Kolodziej, 2000). Assim como o ácido gálico, sua ação tem sido mais eficiente para as espécies *C. glabrata* e *C. krusei* (Batista et al., 2010; Latte, Kolodziej, 2000). Sendo assim, pode-se sugerir que a eficiência do extrato B contra *C. krusei* pode estar relacionada também à presença da corilagina. Também foram correlacionadas à corilagina atividade antibacteriana (Shimizu et al., 2001; Fogliani et al., 2005), e antiviral contra herpes vírus (Yang et al., 2007) e HIV-1 (Notka et al., 2003).

As demais moléculas encontradas ainda não possuem ação antifúngica descrita na literatura, porém outras ações biológicas vêm sendo relatadas. O flavonóide vitexina, detectado nos extratos B e C de *B.*

*tomentosa*, apresenta propriedades antivirais (Li YL et al., 2002), antibacterianas (Basile et al., 1999), antioxidantes e bloqueador de raios ultravioleta (Kim JH et al., 2005). Adicionalmente, também apresenta ação inibidora da formação de produtos finais glicosados, os quais se acumulam principalmente em diabéticos e aumentam problemas renais, neuropáticos e oculares (Peng et al., 2008). Por outro lado, tal molécula também tem sido correlacionada à diminuição da adipogênese, podendo ser útil no combate da obesidade (Kim et al., 2010). O alcalóide buchenavianina detectado no extrato B, já teve seu poder antiretroviral relatado (Beutler et al., 1992).

O terpenóide 1 $\alpha$ ,23 $\beta$ -dihidroxi-12-oleaneno-29-ácido-oico-23 $\beta$ -O- $\alpha$ -L-4-acetilramnopiranosida, do grupo dos triterpenóides, apresentou boa ação antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Angeh et al., 2007a). O eschweilenol C apresentou ação contra a enzima ácido graxo sintase de *S. cerevisiae*. Todavia, não mostrou ação antifúngica contra *C. albicans* e *C. neoformans* (Li XC et al., 2002).

A combregenina, substância detectada no extrato C de *B. tomentosa* apresenta ação antiinflamatória (Ponou et al., 2008). Apesar de não ser relatada na literatura ação antifúngica da combregenina, estudos futuros deverão ser realizados para essa verificação, principalmente para *C. glabrata*. A combregenina foi encontrada apenas no extrato C de *B. tomentosa* e foi apenas para *C. glabrata* que este extrato mostrou-se mais eficiente que o extrato B. Além disso, as outras atividades biológicas das substâncias encontradas nos extratos B e C de *B. tomentosa*, sugerem o uso destes extratos para outras finalidades tais como estudo de seu potencial antibacteriano, antiinflamatório e antioxidante.

A proposta da busca de métodos antifúngicos alternativos, como por exemplo, os extratos aquosos de *B. tomentosa* os quais foram estudados no presente trabalho, é de grande importância. A resistência

do gênero *Candida* frente aos antifúngicos convencionais vem sendo amplamente relatada na literatura (Borg-von Zepelin et al., 2007; Lee et al., 2010, Pfaler et al., 2010; Panizo et al., 2009). Além disso, os antifúngicos tradicionais possuem diversas limitações, como por exemplo, espectro inadequado de atividade, pequeno índice de tolerância, interações com outras drogas, perfil farmacocinético inadequado e custo excessivo (Lewis, Graybill, 2008). A nefrotoxicidade dos antifúngicos polienos (Wingard et al., 1999; Bates et al., 2001) e a hepatotoxicidade das equinocandidas (Johnson, Perfect, 2003; Rex et al., 2001; Rybowicz, Gurk-Turner, 2002) e a necessidade do uso de azóis por tempos prolongados devido sua ação fungistática (White et al., 1998; Yu et al., 2005) justificam tais alternativas.

Os extratos de *Combretum* e *Terminalia* (Combretaceae) vêm sendo relatados como extratos com relativa baixa citotoxicidade (Masoko, 2006; Angeh et al., 2007b). Apesar de criadores de bovinos afirmarem que a ingestão de frutos de *B. tomentosa* pelos bovinos causava morte ou abortamento, Nunes et al. (2010) verificaram efeito citotóxico leve na gestação de ratas incrementando em 10% da dieta das ratas os frutos de *B. tomentosa*. Para melhor elucidação da toxicidade de *B. tomentosa*, testes de citotoxicidade utilizando os extratos aquosos B e C de *B. tomentosa* devem ser realizados.

O presente estudo demonstrou boa ação antifúngica sobre as cepas de origem hospitalar isoladas no trabalho de Khouri (2010) que observou a resistência de algumas de suas cepas de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* frente a importantes antifúngicos convencionais, tais como fluconazol, itraconazol e anfotericina B. Das cepas de *C. tropicalis* resistentes ao fluconazol (isolados 50 e 51), encontrou-se atividade fungistática para ambas. A cepa 51 apresentou CIMs de 3,12 mg/ml para ambos extratos. Das amostras resistentes a anfotericina B (isolados 37 e 54), chamam atenção os resultados obtidos

para a cepa 37 frente ao extrato B, já que o mesmo apresentou atividade fungistática (CIM: 1,56 mg/ml) e fungicida (CFM: 6,25 mg/ml) nesta cepa.

Para *C. parapsilosis*, das duas cepas resistentes a anfotericina B (isolados 07 e 52), destaca-se a cepa 52, que apresentou CIMs de 3,12 para ambos os extratos. Dentre as resistentes ao fluconazol (isolados 49, 52 e 98) as CIMs variaram entre 0,2 e 3,12 mg/ml, com destaque para cepa 98, que além de se tratar de uma cepa isolada de infecção hospitalar, obteve CIMs de 0,2 e 0,39 mg/ml para os extratos B e C, respectivamente.

Das 8 cepas de *C. glabrata*, 4 foram resistentes ao fluconazol e ao itraconazol (isolados 16, 32, 36, 40 e 96), sendo que a cepa 63 foi resistente apenas ao fluconazol.

Os excelentes resultados dos extratos aquosos de *B. tomentosa* frente às cepas de *C. glabrata* de origem hospitalar e isoladas de lesões de candidose eritematosa abrem uma boa perspectiva de uma possível utilização terapêutica dos extratos de *B. tomentosa* frente a esta levedura, já que usualmente *C. glabrata* é resistente aos antifúngicos convencionais (Tsai, Bobek, 1997), é importante causadora de candidoses orais eritematosas (Song et al., 2009) e já foi relatada como segunda ou terceira levedura do gênero *Candida* isoladas de infecções nosocomiais (Pfaller al., 1996; Sanguinetti et al., 2005; Pfaller et al., 2010). Contudo, estudos mais aprofundados quanto à toxicidade destes extratos são necessários.

## 7 CONCLUSÃO

Baseando-se nos resultados obtidos, conclui-se:

- a) Os extratos de *Buchenavia tomentosa* estudados no screening apresentaram atividade antifúngica para todas as cepas padrão de *Candida* spp., exceto para *Candida tropicalis*;
- b) Os extratos B (água/100 °C/5 minutos) e C (água/55 °C/60 minutos) foram os dois extratos mais efetivos;
- c) As cepas de *Candida* spp. (padrão, de origem hospitalar e isoladas de lesões de candidose bucal eritematosa), mais sensíveis aos extratos foram as de *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida dubliniensis* e *Candida parapsilosis* e as cepas mais resistentes foram as de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*;
- d) O extrato B foi mais eficiente para todas as cepas de *Candida* spp. (padrão, de origem hospitalar e isoladas de lesões de candidose bucal eritematosa), exceto para *Candida glabrata*;
- e) Foi possível, através da espectrometria de massas por injeção direta eletrospray (ESI-MS) verificar a presença de moléculas bioativas importantes em ambos os extratos, algumas com ação antifúngica já conhecida, como o ácido gálico, kaempferol e corilagina.

## 8 REFERÊNCIAS \*

Abi Said D, Anaissie E. Epidemiology of Non-*albicans* *Candida* spp. *Bailliere's Clinical Infect Dis.* 1998;7:1131-33.

Adamoli J. O Pantanal e suas relações fitogeográficas com os cerrados: discussão sobre o conceito de complexo do Pantanal. *Anais do 32º Congresso Nacional de Botânica*; 1981; Teresina: Sociedade Brasileira de Botânica; Universidade Federal do Piauí; 1981. p.109-19.

Adnyana IK, Tezuka Y, Awale S, Banskota AH, Tran KQ, Kadota S. Quadranosides VI-XI, six new triterpene glucosides from the seeds of *Combretum quadrangulare*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2000 Aug;48(8):1114-20.

Ahond A, Fournet A, Moretti C, Philogene E, Poupat C, Thoison O, et al. Premiers alcaloïdes vrais isolés de Combretacées, *Buchenavia macrophylla* Eichl. et *Buchenavia capitata* Eichl. *Bulletin de La Société chimique de France*. 1984;(1-2):41-5. Française.

Akins RA. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol.* 2005 Jun;43(4):285-318.

Al-Fattani MA, Douglas LJ. Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Sep;48(9):3291-7.

---

\* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Angeh JE, Huang X, Swan GE, Möllman U, Sattler I, Eloff JN. Novel antibacterial triterpenoid from *Combretum padoides* (Combretaceae). *Arkivoc.* 2007a;(ix):113-20.

Angeh JE, Huang X, Sattler I, Swan GE, Dahse H, Härtl A, et al. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of four known and one new triterpenoid from *Combretum imberbe* (Combretaceae). *J Ethnopharmacol.* 2007b Mar 1;110(1):56-60.

Aperis G, Myriounis N, Spanakis EK, Mylonakis E. Developments in the treatment of candidiasis: more choices and new challenges. *Expert Opin Investig Drugs* 2006 Nov;15:(11)1319-36.

Asmundsdóttir LR, Erlendsdóttir H, Haraldsson G, Guo H, Xu J, Gottfredson M. Molecular epidemiology of candidemia: evidence of clusters of smoldering nosocomial infections. *Clin Infect Dis.* 2008 Jul 15;47(2):e17-24.

Baba-Moussa F, Akpagana K, Bouchet P. Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* 1999 Sep;66(3):335-8.

Baillie GS, Douglas LJ. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J Antimicrob Chemother.* 2000 Sep;46(3):397-403.

Basile A, Giordano S, López-Sáez JA, Cobianchi RC. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry.* 1999 Dec;52(8):1479-82.

Bassetti M, Righi E, Costa A, Fasce R, Molinari MP, Rosso R, et al. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. *BMC Infect Dis.* 2006 Feb 10;6:21.

Bates DW, Su L, Yu DT, Chertow GM, Seger DL, Gomes DR, et al. Correlates of acute renal failure in patients receiving parenteral amphotericin B. *Kidney Int.* 2001 Oct;60(4):1452-9.

Batista AL, Violante IMP, Garcez WS, Garcez FR. 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.

Beutler JA, Cardellina II JH, McMahon JB, Boyd MR, Cragg GM. Anti-HIV and Cytotoxic Alkaloids from *Buchenavia capitata*. J Nat Prod. 1992 Feb;55(2):207–213.

Bonassoli LA, Bertoli M, Svidzinski TIE. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. J Hosp Infect. 2005 Feb;59(2):159-62.

Borg-von Zepelin M, Kunz L, Rüchel R, Reichard U, Weig M, Gross U. Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. to six antifungal agents: results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005. J Antimicrob Chemother. 2007 Aug;60(2):424-8.

Braga FG, Bouzada ML, Fabri RL, de O Matos M, Moreira FO, Scio E, et al. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. J Ethnopharmacol. 2007 May 4;111(2):396-402.

Brasil. Decreto Federal no 5.813, de 22 de junho de 2006. Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterapia. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm). Acessado: Set 2008.

Brevis AP, Cancino MJ, Cantín LM. Estomatitis subprotesis: estudio clinico y microbiologico de *Candida*. Int J Odontostomat. 2008;2(1):101-8.

Brito AR, Brito AA. Forty years of Brazilian medical plant research. J Ethnopharmacol. 1993 May;39(1):53-67.

Brunskole M, Zorko K, Kerbler V, Martens S, Stojan J, Gobec S, et al. Trihydroxynaphthalene reductase of *Curvularia lunata* - a target for flavonoid action? Chem Biol Interact. 2009 Mar 16;178(1-3):259-67.

Burkhill HM. The useful plants of west tropical Africa. Kew: Royal Botanic Gardens; 1985. 960 p.

Camacho DP, Gasparetto A, Svidzinski TI. The effect of chlorhexidine and gentian violet on the adherence of *Candida* spp. to urinary catheters. *Mycopathologia*. 2007 May;163(5):261-6.

Canpolat FE, Çekmez F , Tezer H. Chorioamnionitis and neonatal sepsis due to *Candida tropicalis* Arch Gynecol Obstet. 2011 Apr;283(4):919-20.

Chan T. Fatal *Candida dubliniensis* septicemia in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis*. 2005 Apr 15;40(8):1209-10.

Chunchanur SK, Nadgir SD, Halesh LH, Patil BS, Kausar Y, Chandrasekhar MR. Detection and antifungal susceptibility testing of oral *Candida dubliniensis* from human immunodeficiency virus-infected patients. *Indian J Pathol Microbiol*. 2009 Oct-Dec;52(4):501-4.

Colegate SM, Molyneux RJ. Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination. Boca Raton: CRC; 1993.

Colombo AL, Nakagawa Z, Valdetaro F, Branchini ML, Kussano EJ, Nucci M. Susceptibility profile of 200 bloodstream isolates of *Candida* spp. collected from Brazilian tertiary care hospitals. *Med Mycol*. 2003 Jun;41(3):235-9.

Crastechini E, Machado SF, Teodoro GR, Koga-Ito CY, Almeida JD. Efeitos do óleo ozonizado na presença do gênero *Candida* em pacientes com estomatite protética. In: 26<sup>a</sup> Reunião Anual da SBPqO, 09-13 set 2009. Águas de Lindóia. *Brazilian Oral Research*. 2009 Sep;23(1):96.

Eggimann P, Garbino J, Pittet, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis*. 2003 Nov;3(11):685-702.

Eloff JN. The antibacterial activity of 27 southern African members of the Combretaceae. *South African J Sci*. 1999 Mar;95(3):148-52.

Eloff JN, Jäger AK., Van Staden J. The stability and relationship between anti-inflammatory activity and antibacterial properties of southern African *Combretum* species. South African J Sci. 2001;97(7-8):291-3.

Embrapa. Pantanal [Texto da internet]. Disponível em <http://www.cpap.embrapa.br>. Acessado em: Dez 2007.

Farnsworth, NR. Testando plantas para novos remédios. In: Wilson EO. Biodiversidade. Rio de Janeiro: Nova Fronteira; 1997. p.107-25.

Ferro D. Fitoterapia: conceitos clínicos. São Paulo: Atheneu; 2006.

Figueiral MH, Azul A, Pinto E, Fonseca PA, Branco FM, Scully C. Denture-related stomatitis: identification of a etiological and predisposing factors - a large cohort. J Oral Rehabil. 2007 Jun;34(6):448-55.

Fiot J, Sanon S, Azas N, Mahiou V, Jansen O, Angenot L, et al. Phytochemical and pharmacological study of roots and leaves of *Guiera senegalensis* J.F. Gmel (Combretaceae). J Ethnopharmacol. 2006 Jun 30;106(2):173-8.

Fogliani B, Raharivelomanana P, Bianchini JP, Bouraïma-Madjèbi S, Hnawia E. Bioactive ellagitannins from *Cunonia macrophylla*, an endemic Cunoniaceae from New Caledonia. Phytochemistry. 2005 Jan;66(2):241-7.

Fridkin SK, Kaufman D, Edwards JR, Shetty S, Horan T. Changing incidence of *Candida* bloodstream infections among nicu patients in the united states: 1995-2004. Pediatrics. 2006 May;117(5):1680-7.

Fujita K-I, Kubo I. Antifungal activity of octyl gallate. Int J Food Microbiol. 2002 Dec 15;79(3):193-201.

Fyhrquist P, Mwasumbi L, Haeggstrom CA, Vuorela H, Hiltunen R, Vuorela P. Ethnobotanical and antimicrobial investigation on some species of *Terminalia* and *Combretum* (Combretaceae) growing in Tanzania. J Ethnopharmacol. 2002 Feb;79(2):169-77.

Gilfillan G, Sullivan D, Haynes K, Parkinson T, Coleman DC, Gow NAR. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. *Microbiol* 1998 Apr;144:829-38.

Girmenia C, Martino P, De Bernardis F, Gentile G, Boccanera M, Monaco M, et al. Rising incidence of *Candida parapsilosis* fungemia in patients with hematologic malignancies: clinical aspects, predisposing factors, and differential pathogenicity of the causative strains. *Clin Infect Dis*. 1996 Sep;23(3):506-14.

Guarim Neto G, Carniello MA. Etnoconhecimento e saber local: um olhar sobre populações humanas e os recursos vegetais. In: Albuquerque UP, Alves AGC, Araújo TSA editores. Povos e paisagens: etnobiologia, etnoecologia e biodiversidade no Brasil. Recife: Nuppea/UFRPE, 2007. p. 107-14.

Hager JL, Mir MR, Hsu S. *Candida krusei* fungemia in an immunocompromised patient. *Dermatol Online J*. 2010 Apr 15;16(4):5.

Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, Lyon GM, Arthington-Skaggs BA, Mirza SA, et al. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J Clin Microbiol*. 2004 Apr;42(4):1519-27.

Hawser SP, Douglas LJ. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 Sep;39(9):2128-31.

Hedderwick SA, Wan JY, Bradley SF, Sangeorzan JA, Terpening MS, Kauffman CA. Risk factors for colonization with yeast species in a Veterans Affairs long-term care facility. *J Am Geriatr Soc*. 1998 Jul;46(7):849-53.

Holder IA, Boyce ST. Agar well diffusion assay testing of bacterial susceptibility to various antimicrobials in concentrations non-toxic for human cells in culture. *Burns*. 1994 Oct;20(5):426-9.

Hope W, Morton A, Eisen DP. Increase in prevalence of nosocomial non-*Candida albicans* candidaemia and the association of *Candida krusei* with fluconazole use. *J Hosp Infect.* 2002 Jan;50(1):56-65.

Hutchings A, Scott AH, Lewis G, Cunningham AB. Zulu Medicinal plants: an inventory. Pietermaritzburg: University of Natal Press; 1996. 450 p.

Hwang EI, Ahn BT, Lee HB, Kim YK, Lee KS, Bok SH, et al. Inhibitory activity for chitin synthase II from *Saccharomyces cerevisiae* by tannins and related compounds. *Planta Med.* 2001 Aug;67(6):501-4.

Iwu MM. Handbook of African Medicinal Plants. Boca Raton: CRC Press; 1993. 413 p.

Janeway Jr CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Ann Rev Immunol.* 2002;20:197-216.

Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. *Clin Infect Dis.* 1995 Jun;20(6):1526-30.

Jayatilake JA, Samaranayake YH, Cheung LK, Samaranayake LP. Quantitative evaluation of tissue invasion by wild type, hyphal and SAP mutants of *Candida albicans*, and non-albicans *Candida* species in reconstituted human oral epithelium. *J Oral Pathol Med.* 2006 Sep;35(8):484-91.

Johnson MD, Perfect JR. Caspofungin: first approved agent in a new class of antifungals. *Expert Opin Pharmacother.* 2003 May;4(5):807-23.

Jossang A, Seuleiman M, Maidou E, Bodo B. Pentacyclic triterpenes from *Combretum nigricans*. *Phytochemistry.* 1996 Feb;41(2):591-94.

Khouri S. Leveduras isoladas de pacientes internados em hospital universitário da cidade de Taubaté-SP [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas (SP):Universidade de São Paulo - USP; 2010.

Kiehn TE, Edwards FF, Armstrong D. The prevalence of yeasts in clinical specimens from cancer patients. *Am J Clin Pathol.* 1980 Apr;73(4):518-21.

Kim J, Lee I, Seo J, Jung M, Kim Y, Yim N, et al. Vitexin, orientin and other flavonoids from *Spirodela polyrhiza* inhibit adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Phytother Res.* 2010 Oct;24(10):1543-8.

Kim JH, Lee BC, Kim JH, Sim GS, Lee DH, Lee KE, et al. The isolation and antioxidative effects of vitexin from *Acer palmatum*. *Arch Pharm Res.* 2005 Feb;28(2):195-202.

Kim SY, Jin YR, Lim Y, Kim JH, Cho MR, Hong JT. Inhibition of PDGF b-receptor tyrosine phosphorylation and its downstream intracellular signal transduction in rat aortic vascular smooth muscle cells by kaempferol. *Planta Med.* 2005 Jul;71(7):599-603.

Kiraz N, Oz Y. Species distribution and in vitro antifungal susceptibility of clinical *Candida* isolates from a university hospital in Turkey over a 5-year period. *Med Mycol.* 2011 Feb;49(2):126-31.

Klopper RR, Chatelain C, Bänninger V, Steyn HM, De Wet BC, Arnold TH, et al. Checklist of the flowering plants of Sub-Saharan Africa. An index of accepted names and synonyms. Pretoria: Sabonet; 2006. 894 p.

Krcmery V, Barnes, AJ. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect.* 2002 Apr;50(4):243-60.

LaFleur MD, Kumamoto CA, Lewis K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Nov;50(11):3839-46.

Latte KP, Kolodziej H. Antifungal effects of hydrolysable tannins and related compounds on dermatophytes, mould fungi and yeasts. *Z Naturforsch C.* 2000 May-Jun;55(5-6):467-72.

Lee MK, Young D, Kim M, Kim MN, Lee K. Species Distribution and antifungal susceptibilities of yeast clinical isolates from three hospitals in Korea, 2001 to 2007. *Korean J Lab Med.* 2010 Aug;30(4):364-72.

Leitão DPS, Silva Filho AA, Polizello ACM, Bastos JK, Spadaro ACC. Comparative evaluation of in-vitro effects of brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. *Biol Pharm Bull.* 2004 Nov;27(11):1834-9.

Lewis JS, Graybill JR. Fungicidal versus Fungistatic: what's in a word? *Expert Opin Pharmacother.* 2008 Apr;9(6):927-35.

Li XC, Joshi AS, ElSohly HN, Khan SI, Jacob MR, Zhang Z et al. Fatty acid synthase inhibitors from plants: isolation, structure elucidation, and SAR studies. *J Nat Prod.* 2002. Dec;65(12):1909-14.

Li YL, Ma SC, Yang YT, Ye SM, But PP. Antiviral activities of flavonoids and organic acid from *Trollius chinensis* Bunge. *J Ethnopharmacol.* 2002 Mar;79(3):365-8.

Lim YH, Kim IH, Seo JJ. In vitro activity of kaempferol isolated from the *Impatiens balsamina* alone and in combination with erythromycin or clindamycin against *Propionibacterium acnes*. *J Microbiol.* 2007 Oct;45(5):473-7.

Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Jr VF. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quím Nova.* 2002;25(3):429-38.

Malani, A, Hmoud J, Chiu L, Carver PL, Bielaczyc A, Kauffman CA. *Candida glabrata* fungemia: experience in a tertiary care center. *Clin. Infect. Dis.* 2005 Oct;41:975-81.

Marquete NFS, Valente MC. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Combretaceae. *Rodriguésia.* 2005 Mar;56(86):131-40.

Martini ND, Katerere DRP, Eloff JN. Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *J Ethnopharmacol.* 2004 Aug;93(2-3):207-12.

Martins ER. Plantas medicinais. Viçosa: Ed. UFV, 2000. 220p.

Masoko P. Characterisation of antifungal compounds isolated from *Terminalia* and *Combretum* species (Combretaceae) [thesis]. Pretoria: University of Pretoria; 2006.

Masoko P, Eloff JN. Screening of twenty-four South African *Combretum* and six *Terminalia* species (Combretaceae) for antioxidant activities. Afr J Tradit Complement Altern Med. 2006 Nov;4(2):231-39.

Masoko P, Picard J, Eloff JN. Antifungal activities of six South African *Terminalia* species (Combretaceae). J Ethnopharmacol. 2005 Jun 3;99(2):301-8.

Masoko P, Picard J, Eloff JN. The antifungal activity of twenty-four southern African *Combretum* species (Combretaceae). South African J Botany. 2007 Apr;73(2):173-83.

Menezes TOA, Alves ACBA, Vieira JMS, Menezes SAF, Alves BP, Mendonça LCV. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. Rev Odontol UNESP. 2009; 38(3): 184-91.

Metwally L, Walker MJ, Coyle PV, Hay RJ, Hedderwick S, McCloskey BV, et al. Trends in candidemia and antifungal susceptibility in a university hospital in Northern Ireland 2001–2006. J Infect. 2007 Aug;55(2):174-8.

Mitidiero AMA. Potencial do uso de homeopatia, bioterápicos e fitoterapia como opção na bovinocultura leiteira: avaliação dos aspectos sanitários e de produção [dissertação]. Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. 2002. 119 p.

Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. Braz J Microbiol. 2000 Oct;31:1-16.

Navarro DF, Santos EAT, Rocha JCF, Bremm LL, Jukoski M, Ribeiro PG, Kozlowski Jr VA. Efeitos do digluconato de clorexidina, *Plantago major* e placebo sobre placa dental e gengivite: uma comparação clínica da eficácia de colutórios. Rev Bras PI Med. 1998 Ago;1(1):28-38.

NCCLS/CLSI. Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras: norma aprovada – 2ed. NCCLS document M27-A2 (ISBN 1- 56238-469-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 U.S.A., 2002).

Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NA. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. Nat Rev Microbiol. 2008 Jan;6(1):67-78.

Neuwinger HD. African ethnobotany poison and drugs (Chemistry, Pharmacology, Toxicology). London: Chapman and Hall; 1996. 941 p.

Nobile CJ, Schneider HA, Nett JE, Sheppard DC, Filler SG, Andes DR, et al. Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. Curr Biol. 2008 Jul 22;18(14):1017-24.

Notka F, Meier GR, Wagner R. Inhibition of wild-type human immunodeficiency virus and reverse transcriptase inhibitor-resistant variants by *Phyllanthus amarus*. Antiviral Res. 2003 Apr;58(2):175-86.

Nucci M, Colombo AL. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007 May;58(1):77-82.

Nunes HMM, Paiva JA, Ramos AT, Maiorka PC, Maruo VM. Effects of *Buchenavia tomentosa* consumption on female rats and their offspring Acta Scientiarum. Biological Sciences Maringá. 2010; 32(4):423-9.

Odds FC. Pathogenesis of *Candida* infections. J Am Acad Dermatol. 1994 Sep;31(3 Pt 2):S2-5.

Oliver-Bever B. Medicinal Plants in Tropical West Africa. Cambridge: Cambridge University Press; 1986. 375 p.

Panizo MM, Reviákina V, Dolande M, Selgrad S. *Candida* spp. in vitro susceptibility profile to four antifungal agents. Resistance surveillance study in Venezuelan strains. *Med Mycol*. 2009 Mar;47(2):137-43.

Passos XS, Sales WS, Maciel PJ, Costa CR, Miranda KC, Lemos JA, et al. *Candida* colonization in intensive care unit patients' urine. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005 Dec;100(8):925-8.

Peng X, Zheng Z, Cheng KW, Shan F, Ren GX, Chen F, et al. Inhibitory effect of mung bean extract and its constituents vitexin and isovitexin on the formation of advanced glycation endproducts. *Food Chemistry*. 2008 Jun;106(2):475-81.

Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Moet GJ, Jones RN. Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010 Nov;68(3):278-83.

Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Jan;20(1):133-63.

Pfaller MA. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin Infect Dis*. 1996 May;22 Suppl 2:S89-94.

Pitarch A, Nombela C, Gil C. *Candida albicans* biology and pathogenicity: insights from proteomics. *Methods Biochem Anal*. 2006;49:285-330.

Ponou BK, Barboni L, Teponno RB, Mbiantcha M, Nguelefack TB, Park HJ et al. Polyhydroxyoleanane-type triterpenoids from *Combretum molle* and their anti-inflammatory activity. *Phytochemistry Letters*. 2008;1:183-87.

Pott A, Pott VJ. Plantas do Pantanal. Brasília: Embrapa; 1994.

Raad I. Intravascular-catheter-related infections. *Lancet*. 1998 Mar 21;351(9106):893-8.

Ramage G, Martínez JP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res*. 2006 Nov;6(7):979-86.

Rex JH, Walsh TJ, Nettleson M, Anaissie EJ, Bennett JE, Bow EJ, et al. Need for alternative trial designs and evaluation strategies for therapeutic studies of invasive mycoses. *Clin Infect Dis*. 2001 Jul;33(1):95-106.

Rho J, Shin JH, Song JW, Park MR, Kee SJ, Jang SJ, et al. Molecular investigation of two consecutive nosocomial clusters of *Candida tropicalis* candiduria using pulsed-field gel electrophoresis. *J Microbiol*. 2004 Jun;42(2):80-6.

Richardson MD. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Sep;56 (Suppl 1):i5-11.

Roesler R, Catharino RR, Malta LG, Eberlin MN, Pastore G. Antioxidant Activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and Characterization of components by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Food Chem*. 2008 Oct;110(3):711-17.

Rybowicz J, Gurk-Turner C. Caspofungin: the first agent available in the echinocandin class of antifungals. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 2002 Jan;15(1):97-9.

Saiman L, Ludington E, Pfaller M, Rangel-Frausto S, Wiblin RT, Dawson J, et al. Risk factors for candidemia in neonatal intensive care unit patients. *Pediatr Infect Dis J*. 2000 Apr;19(4):319-24.

Salgado-Parreño FJ, Alcoba-Flórez J, Arias A, Moragues MD, Quindós G, Pontón J, Arévalo MP. In vitro activities of voriconazole and five licensed antifungal agents against *Candida dubliniensis*: comparison of CLSI M27-A2, Sensititre YeastOne, disk diffusion, and Etest methods. *Microb Drug Resist*. 2007 Jan;12(4):246-51.

Salvador MJ, Zucchi OLAD, Candido RC, Ito IY, Dias DA. In vitro antimicrobial activity of crude extracts and isolated constituents of *Alternanthera maritima* (Amaranthaceae). *Pharmaceutical Biology*. 2004;42(2):138-48.

Sanguinetti M, Posteraro B, Fiori B, Ranno S, Torelli R, Fadda G. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Feb;49(2):668-79.

Schmourlo G, Mendonça-Filho RR, Alviano CS, Costa SS. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. *J Ethnopharmacol*. 2005 Jan;96(3):563-8.

Seneviratne CJ, Jin L, Samaranayake LP. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Dis*. 2008 Oct;14(7):582-90.

Shimizu M, Shiota S, Mizushima T, Ito H, Hatano T, Yoshida T et al. Marked potentiation of activity of beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by corilagin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Nov;45(11):3198-201.

Shukla YN, Srivastava A, Kumar S, Kumar S. Phytotoxic and antimicrobial constituents of *Argyrea speciosa* and *Oenothera biennis*. *J Ethnopharmacol*. 1999 Nov 1;67(2):241-5.

Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Med Mycol*. 2009 Nov;47(7):681-9.

Silver LL, Bostian KA. Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993 Mar; 37(3):377-83.

Song X, Sun J, Støre G, Hansen BF, Olsen I. Colony morphologies, species, and biotypes of yeasts from thrush and denture stomatitis. *Acta Odontol Scand*. 2009 May;28:1-8.

Stokes C, Moran GP, Spiering MJ, Cole GT, Coleman DC, Sullivan DJ. Lower filamentation rates of *Candida dubliniensis* contribute to its lower virulence in comparison with *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol.* 2007 Sep; 44(9):920-31.

Stoldt VR, Sonneborn A, Leuker CE, Ernst JF. Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J.* 1997 Apr 15;16(8):1982-91.

Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA et al. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics.* 2002 Aug;110(2 Pt 1):285-91.

Sullivan DJ, Moran GP, Pinjon E, Al-Mosaid A, Stokes C, Vaughan C, et al. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 2004 Jan;4(4-5):369-76.

Sweet SP, MacFarlane TW, Samaranayake LP. An in vitro method to study the adherence of bacteria to saliva-treated tooth enamel sections. *Oral Microbiol Immunol.* 1990 Feb;5(1):24-8.

Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Homma K, Okuda K, Kato T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol Immunol.* 2004 Feb;19(1):61-4.

Tamura NK, Gasparetto A, Svidzinski TI. Evaluation of the adherence of *Candida* species to urinary catheters. *Mycopathol.* 2003;156(4):269-72.

Tan F, Shi S, Zhong Y, Gong X, Wang Y. Phylogenetic relationships of Combretaceae (Combretaceae) inferred from plastid, nuclear gene and spacer sequences. *J Plant Res.* 2002 Dec;115(6):475-81.

Tomazzoni MI, Negrelle RRB, Centa ML. Fitoterapia Popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. *Revista Texto & Contexto – Enfermagem.* 2006 Fev;15(1):115-21.

Tsai H, Bobek LA. Studies of the mechanism of human salivary histatin-5 candidacidal activity with histatin-5 variants and azolesensitive and -resistant *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997 Oct;41(10):2224-8.

Tsuchiya H, Sato M, Iinuma M, Yokoyama J, Ohyama M, Tanaka T, et al. Inhibition of the growth of cariogenic bacteria in vitro by plant flavanones. *Experientia.* 1994 Sep;50(9):846-49.

Turolla MSR, Nascimento ES. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Braz J Pharm Sci.* 2006 Abr/Jun;42(2):290-306.

van Asbeck EC, Clemons KV, Stevens DA. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Crit Rev Microbiol.* 2009;35(4):283-309.

van der Meer JW, van de Veerdonk FL, Joosten LA, Kullberg BJ, Netea MG. Severe *Candida* spp. infections: new insights into natural immunity. *Int J Antimicrob Agents.* 2010 Dec;36 Suppl 2:S58-62.

Vazquez JA, Sanchez V, Dmuchowski C, Dembry LM, Sobel JD, Zervos MJ. Nosocomial acquisition of *Candida albicans*: an epidemiologic study. *J Infect Dis.* 1993 Jul;168(1):195-201.

Vos MC, Endtz HP, Horst-Kreft D, Doorduyn J, Lugtenburg E, Verbrugh HA, et al. *Candida krusei* transmission among hematology patients resolved by adapted antifungal prophylaxis and infection control measures. *J Clin Microbiol* 2006 Mar;44:1111-14.

Vuong C, Kocianova S, Voyich JM, Yao Y, Fischer ER, DeLeo FR et al. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem.* 2004 Dec 24;279(52):54881-6.

Wang L, Tu YC, Lian TW, Hung JT, Yen JH, Wu MJ. Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols. *J Agric Food Chem*. 2006 Dec 27;54(26):9798-804.

Weinberger M, Leibovici L, Perez S, Samra Z, Ostfeld I, Levi I, et al. Characteristics of candidaemia with *Candida albicans* compared with non *albicans Candida* species and predictors of mortality. *J Hosp Infect*. 2005 Oct;61(2):146-54.

White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1998 Apr;11:382-402.

Williams DW, Kuriyama T, Silva S, Malic S, Lewis MAO. *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontol* 2000. 2011 Feb;55(1):250-65.

Wingard JR, Merz WG, Rinaldi MG, Johnson TR, Karp JE, Saral R. Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *N Engl J Med*. 1991 Oct 31;325(18):1274-7.

Wingard JR. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin Infect Dis*. 1995 Jan;20(1):115-25.

Wingard JR, Kubilis P, Lee L, Yee G, White M, Walshe L, et al. Clinical significance of nephrotoxicity in patients treated with amphotericin B for suspected or proven aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 1999 Dec;29(6):1402-7.

Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*. 2004 Aug 1;39(3):309-17.

World Health Organization. Traditional Medicine Strategy 2002–2005, Geneva: WHO; 2002.

Yang CM, Cheng HY, Lin TC, Chiang LC, Lin CC. Hippomanin A from acetone extract of *Phyllanthus urinaria* inhibited HSV-2 but not HSV-1 infection in vitro. *Phytother Res.* 2007 Dec;21(12):1182-6.

Yang SW, Zhou BN, Wisse JH, Evans R, van der Werff H, Miller JS et al. Three new ellagic acid derivatives from the bark of *Eschweilera coriacea* from the Suriname rainforest. *J Nat Prod.* 1998 Jul;61(7):901-6.

Yordanov M, Dimitrova P, Patkar S, Saso L, Ivanovska N. Inhibition of *Candida albicans* extracellular enzyme activity by selected natural substances and their application in *Candida* infection. *Can J Microbiol.* 2008 Jun;54(6):435-40.

Yu DT, Peterson JF, Seger DL, Gerth WC, Bates DW. Frequency of potential azole drug-drug interactions and consequences of potential fluconazole drug interactions. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2005 Nov;14(11):755-67.

## ANEXO A - Documento do comitê de ética das cepas de origem hospitalar



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil  
Telefone: (55) (11) 3091.7733 telefax: (55) (11) 3091-7438  
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 11 de abril de 2006.

### PARECER 702/CEP

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em 64ª Reunião, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: *"Infecção nosocomial por leveduras do gênero candida: Caracterização fenotípica e genotípica"*.

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão**.

Esclareço a V.Sa. que dentro de 12 meses, relatório do referido projeto deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO  
Coordenador da Comissão de Ética em  
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilma. Sra.  
SONIA KHOURI CROSARIOL  
Departamento de Microbiologia  
Instituto de Ciências Biomédicas -USP

**ANEXO B** - Documento do comitê de ética das cepas isoladas de candidoses eritematosas bucais

**unesp**  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**  
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - Jd. São Dimas  
CEP 12201-970 - F. (12) 3947-9028  
Fax (12) 3947-9010 / suely@focjo.unesp.br

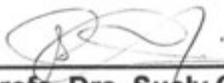
---

**CERTIFICADO**

**Comitê de Ética em Pesquisa-Local**

**CERTIFICAMOS**, que o protocolo nº **070/2006-PH/CEP**, sobre **“Utilização de óleo ozonizado no tratamento de Candidíase Eritematosa associada ao uso de prótese total”**, sob a responsabilidade de **JANETE DIAS ALMEIDA** está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 07 de novembro de 2006.

  
**Profa. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi**  
**Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-Local**

