

Universidade Evangélica de Goiás – UniEVANGÉLICA

Curso de Medicina

ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA CAUSADA EM *Candida parapsilosis* POR *Brunfelsia uniflora*

Ana Luiza Silva Lôbo,

Julia Maria de Moraes Ferreira,

Laryssa Naiara de Sá Dutra,

Leilane Campos Guimarães,

Thais Gonçalves Camarço Lima,

Yana Maílla Pamplona Costa

Anápolis, Goiás

2022

Universidade Evangélica de Goiás – UniEVANGÉLICA

Curso de Medicina

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA CAUSADA EM *Candida*
parapsilopsis POR *Brunfelsia uniflora***

Trabalho de curso apresentado à
Iniciação Científica do curso de medicina
da Universidade Evangélica de Goiás -
UniEVANGÉLICA, sob a orientação do
Prof. Dr. Humberto de Sousa Fontoura.

Anápolis, Goiás

2022

**ENTREGA DA VERSÃO FINAL
DO TRABALHO DE CURSO
PARECER FAVORÁVEL DO ORIENTADOR**

À

Coordenação de Iniciação Científica

Faculdade da Medicina – UniEvangélica

Eu, Prof^(a) Orientador Humberto de Sousa Fontoura venho, respeitosamente, informar a essa Coordenação, que os(as) **acadêmicos(as)** Ana Luiza Silva Lôbo, Julia Maria de Moraes Ferreira, Laryssa Naiara de Sá Dutra, Leilane Campos Guimarães, Thais Gonçalves Camarço Lima, Yana Maílla Pamplona Costa, estão com a versão final do trabalho intitulado ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA CAUSADA EM Candida parapsilosis POR Brunfelsia uniflora pronta para ser entregue a esta coordenação.

Declara-se ciência quanto a publicação do referido trabalho, no Repositório Institucional da UniEVANGÉLICA.

Observações:

Anápolis, 23 de maio de 2022.



Professor(a) Orientador(a)

RESUMO

Candida parapsilosis é um fungo, pertencente ao gênero *Candida* e espécie não *albicans*. Sua fungemia está associada ao uso de cateteres, procedimentos cirúrgicos e outros métodos invasivos. Para o tratamento de infecções causadas por *Candida* spp. podem ser utilizados antifúngicos, todavia, algumas espécies podem apresentar resistência intrínseca ou adquirida a esses fármacos. Sendo assim, a busca por plantas medicinais é vista como uma alternativa para novos tratamentos. A *Brunfelsia uniflora*, conhecida como manacá, é utilizada popularmente como antibactericida, antifúngica, diurética e antitérmica, anestésico, abortiva, hipertensiva e alucinógena em altas concentrações. Diante disso, o objetivo do presente trabalho é avaliar se a planta *B. uniflora* possui atividade antiproliferativa contra células de *C. parapsilosis*. Trata-se de um estudo de caráter quantitativo, de abordagem indutiva, com procedimento comparativo estatístico e técnica de documentação direta em laboratório. A coleta de folhas de *B. uniflora* foi realizada na cidade de Anápolis - GO/Brasil. Após obtenção do extrato etanólico e fracionamento, foi realizado o teste de sensibilidade em placas em meio sólido e, com três dias de crescimento, foram transferidas para placas com o mesmo meio de cultura acrescido aos extratos de *B. uniflora* em concentrações variadas. Observou-se que o uso do extrato etanólico de *Brunfelsia uniflora* não possui atividade antiproliferativa sobre a *Candida parapsilosis* nas concentrações utilizadas. Todavia, houve pequena atividade sinérgica com medicamento habitualmente utilizado em infecções fúngicas. Assim, é necessário que outros estudos sejam realizados com maiores concentrações de extrato etanólico na tentativa de obter resultados mais significativos.

Palavras-chave: antifúngicos; *Candida parapsilosis*; *Brunfelsia uniflora*; plantas medicinais.

ABSTRACT

Candida parapsilosis is a fungus belonging to the *Candida* genus and *non-albicans* species. Its fungemia is associated with the use of catheters, surgical procedures and other invasive methods. For the treatment of infections caused by *Candida* spp. antifungals can be used, however, some species may show intrinsic or acquired resistance to these drugs. Therefore, the search for medicinal plants is seen as an alternative for new treatments. *Brunfelsia uniflora*, known as manacá, is popularly used as an antibacterial, antifungal, diuretic and antipyretic, anesthetic, abortifacient, hypertensive and hallucinogenic in high concentrations. Therefore, the objective of the present work is to evaluate whether the plant *B. uniflora* has antiproliferative activity against *C. parapsilosis* cells. This is a quantitative study, with an inductive approach, with a statistical comparative procedure and direct documentation technique in the laboratory. The collection of leaves of *B. uniflora* was carried out in the city of Anápolis - GO/Brazil. After obtaining the ethanol extract and fractionation, the sensitivity test was carried out on plates in solid medium and, after three days of growth, they were transferred to plates with the same culture medium added to the extracts of *B. uniflora* in varying concentrations. It was observed that the use of ethanolic extract of *Brunfelsia uniflora* does not have antiproliferative activity against *Candida parapsilosis* at the concentrations used. However, there was little synergistic activity with medication commonly used in fungal infections. Thus, it is necessary that other studies are carried out with higher concentrations of ethanol extract in an attempt to obtain more significant results.

Keywords: antifungal; *Candida parapsilosis*; *Brunfelsia uniflora*; medicinal plants

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REFERENCIAL TEÓRICO	9
2.1 <i>Candida parapsilopsis</i>	9
2.2 Candidíase	10
2.3 Tratamento medicamentoso	12
2.4 Plantas medicinais em busca de novas terapias	14
2.5 <i>Brunfelsia uniflora</i>	16
3. OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo Geral	18
3.2 Objetivos Específicos	18
4. METODOLOGIA	19
4.1 Coleta do material vegetal	19
4.2 Obtenção dos extratos de <i>B. uniflora</i>	19
4.3 Cultivo e manutenção do fungo	19
4.4 Teste de sensibilidade em placas	19
4.5 Teste de sinergismo	20
4.6 Teste de sensibilidade por disco de difusão	20
5. RESULTADOS	21
5.1 Obtenção do rendimento do extrato de <i>Brunfelsia uniflora</i>	21
5.2 Teste de sensibilidade em placa	21
5.3 Teste de sinergismo	22
5.4 Teste de sensibilidade por disco de difusão	22
6. DISCUSSÃO	24
7. CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Candida parapsilosis*, pertence ao Reino *Fungi*, Filo *Ascomycota*, Classe *Saccharomycetes*, Ordem *Saccharomycetales*, Família *Saccharomycetaceae* e gênero *Candida* (SGARBI; BARBAREDO, 2010). Sua estrutura é composta por um tubo germinativo, presença de pseudomicélio, micélio verdadeiro e produção de clamidósporos. Além disso, suas características fisiológicas incluem assimilação de fontes de carbono e fermentação de fontes de carbono (TEIXEIRA *et al.*, 2011), sendo capazes também, de se reproduzirem de duas formas: assexuadamente, por brotamento ou fissão, e de forma sexuada, podendo ser diploides ou haploides (DIEZMANN *et al.*, 2004).

Dentre as espécies do gênero *Candida*, a *C. parapsilosis* é a espécie não *albicans* mais importante, e sua fungemia está associada ao uso de cateteres intravasculares, a procedimentos cirúrgicos e a alimentação parenteral. Este fungo pode se proliferar em altas concentrações de glicose e se aderir à materiais prostéticos devido à produção de biofilme e à sua capacidade de colonização, com frequência, de pele e mãos (FOCACCIA; VERONESI, 2015). Atualmente, as infecções fúngicas hospitalares constituem um problema relevante em todo o mundo (PAIS *et al.*, 2014), sendo a *C. parapsilosis* considerada a segunda espécie mais frequente de *Candida* em diversos países em relação às infecções da corrente sanguínea (SINGARAVELU; GÁCSER; NOSANCHUK, 2014). Este fungo leveduriforme pode acometer principalmente pacientes imunocomprometidos, neoplásicos e transplantados (CHASSOT *et al.*, 2019).

Para o tratamento de infecções por *Candida* spp., podem ser utilizados polienos, análogos de pirimidina, azóis, equinocandinas e alilaminas. Todavia, algumas espécies podem não ser suscetíveis, mediante resistência intrínseca ou adquirida após exposição a outras drogas (FLEVARI *et al.*, 2013). O estudo de Thomaz *et al.* (2018), realizado no Brasil, identificou que oito de quatorze isolados de *C. parapsilosis* foram resistentes ao Fluconazol e ao Voriconazol.

A busca por plantas com fins medicinais é uma prática muito antiga, ainda utilizada nos dias atuais, e tem sido um método de cura mais palpável, devido ao baixo custo e fácil acesso. Para que essas plantas medicinais possam ser utilizadas pela população de forma mais segura, é necessário que estudos comprovem sua eficácia e outros possíveis efeitos ao organismo (REZENDE; COCCO, 2002). No tratamento de micoses, o uso frequente de antifúngicos produzem recorrência, causam resistência e alguns apresentam significativa toxicidade (ZACCHINO, 2001). Assim, nota-se a importância da busca de novos tratamentos, sendo as plantas com propriedades antifúngicas uma possível alternativa.

Brunfelsia uniflora, popularmente conhecida como manacá, é uma espécie da família *Solenaceae*, facilmente encontrada na Mata Atlântica (PLOWMAN, 1977). Na medicina popular, é utilizada como antibactericida, antifúngica (BEGUM *et al.*, 2007), contra artrite, reumatismo, sífilis, picadas de cobra, febre amarela, e ainda como diurética e antitérmica. Ao ser utilizada em altas concentrações, relata-se que pode ser anestésica, abortiva, hipertensiva, laxativa e alucinógena (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007).

Desse modo, considerando-se o acometimento de pacientes imunocomprometidos, neoplásicos e transplantados (CHASSOT *et al.*, 2019), os altos níveis de infecções fúngicas hospitalares (PAIS *et al.*, 2014) associados à elevada incidência de candidíase localizada e sistêmica, a toxicidade dos antifúngicos existentes e o aparecimento de isolados resistentes e multirresistentes (HAHN *et al.*, 2003; BERGOLD; GEORGIADIS, 2004; SHEIKH *et al.*, 2013; XIE *et al.*, 2014), torna-se de grande importância a busca por novas terapias e métodos de cura baratos e acessíveis, sendo as plantas com propriedades antifúngicas uma alternativa.

Estudos sobre os efeitos da *B. uniflora* em relação a *C. parapsilosis*, mostra-se benéficos para os pacientes. A *C. parapsilosis* é a segunda ou terceira espécie de *Candida* isolada de pacientes com maior frequência (TÓTH *et al.*, 2019), apresentando considerável incidência e prevalência em Unidades de Terapia Intensiva neonatais (YAMAMOTO, 2018). Um estudo recente em pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC – FMRP) em sua Unidade de Emergência (UE - HCFMRP), mostrou que essa espécie de *Candida* produz fatores de virulência, tem uma grande capacidade de formar biofilmes e alta variabilidade genética, o que confirma a resistência a algumas terapias, com medicamentos derivados das equinocandinas e dos azóis (PFALLER *et al.*, 2011; GOVENDER *et al.*, 2016; FERREIRA; CANELA; CARDOSO, 2019), justificando a importância da busca por novas alternativas terapêuticas.

O presente trabalho tem como objetivo analisar a atividade antifúngica da *Brunfelsia uniflora* sobre a *Candida parapsilosis* através da avaliação da capacidade antiproliferativa da planta sobre o fungo em questão, determinando, por fim, a concentração inibitória mínima (CIM) dos diferentes extratos e seus halos de inibição sobre o crescimento fúngico, bem como avaliar a presença de atividade sinérgica com antifúngicos tradicionalmente utilizados no tratamento de candidíase.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Candida parapsilosis*

Candida spp. é pertencente ao reino Fungi, divisão *Eumycota*, subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Saccharomycetes*, família *Saccharomycetaceae*. (SIDRIM; ROCHA, 2004). Até 1940, a *Candida parapsilosis* era considerada não patogênica, até ser descoberta como a causa da endocardite de um paciente usuário de drogas que veio a óbito (KRCMERY; BARNES, 2002; WEEMS, 1992).

Leveduras do gênero *Candida* têm uma relação comensal com os humanos, entretanto, são oportunistas em situações de baixa imunidade e podem causar infecções, conhecidas como candidíase (CALDERONI; FONZI, 2001). *C. parapsilosis* é uma espécie que não gera hifas verdadeiras, mas pseudo-hifas, que são grandes e curvas (LARONE, 2002; TROFA; GACSER; NOSANCHUK, 2008). Morfologicamente podem apresentar formas redondas, ovaladas ou cilíndricas (LAFHEY; BUTLER, 2005). Um importante fator de virulência é a capacidade de produzir enzimas hidrolíticas, proteases e fosfolipases (AGUIAR, 2007). Além disso, a formação de biofilmes, que são comunidades microbianas organizadas e aderidas a substratos, contribuem de forma significativa com a virulência (DONLAN; COSTERTON, 2002). A *C. parapsilosis* produz quantidade significativa de biofilme na presença de glicose, o que pode ocorrer quando o paciente recebe nutrição parenteral, a qual possui alta concentração de glicose (DOUGLAS, 2002; WEBER *et al.*, 2008). Quando cultivada, produz colônias brancas, cremosas, brilhantes, podendo ser lisas ou enrugadas (CALDERONE, 2002). Estudos mostraram que *C. parapsilosis* pode dividir-se em três grupos (*C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*), baseando-se em análises de DNA, eletroforese de isoenzimas, eletroforese de cariótipos, morfotipos, sequências de DNA mitocondrial e produção de biofilmes (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; LAFHEY; BUTLER, 2005; LOGUE *et al.*, 2005; KOCSUBÉ *et al.*, 2007; GULLU *et al.*, 2008).

C. parapsilosis é um dos fungos mais comumente isolados das mãos do homem (BONASSOLI; BERTOLI; SVITZINSKI, 2005). Sua transmissão ocorre pelo contato das mãos dos profissionais de saúde com fluidos, aparelhos e dispositivos, como cateteres, próteses ou outros implantes (VAN ASBECK *et al.*, 2001). Essa espécie é a mais recorrente em infecções na corrente sanguínea, sobretudo em neonatos, pacientes transplantados, associadas a cateteres, e pacientes que recebem nutrição parenteral e prévia terapia antifúngica. Na clínica, a infecção por *C. parapsilosis* é caracterizada por fungemias, endocardites, endoftalmite,

artrites e peritonites (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; LAFFEY; BUTLER, 2005; LOGUE *et al.*, 2005; KOCSUBÉ *et al.*, 2007; GULLU *et al.*, 2008). Em um estudo multicêntrico, Colombo *et al.* (2006) revelou que, dos 712 pacientes com candidíase, 20,5% foram causadas por *C. parapsilosis*, correspondendo ao 3º de maior prevalência. Os seguintes antifúngicos apresentaram atividade contra cepas isoladas de *C. parapsilosis*: azólicos, poliênicos, flucitosinas e equinocandinas (CAPPELLETY; EISELSTEIN-MCKITRICK, 2007). Estudos mostram que as cepas também não possuem resistência a voriconazol ou caspofungina (ODDS *et al.*, 2007).

2.2 Candidíase

A candidíase é uma infecção causada por leveduras do gênero *Candida*, sendo o agente mais comum a *Candida albicans*. Apesar desse fato, espécies não *C. albicans* (NCA) tornaram-se significativamente prevalentes como a *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, e *Candida tropical* (FIDEL; VAZQUEZ; SOBEL, 1999; SAN MIGUEL *et al.*, 2005). O estudo de Sadeghi *et al.* (2018) identificou a *C. parapsilosis* como a principal espécie de NCA em pacientes com candidíase, principalmente em espécimes de unha e pele. O aumento da incidência de candidemia por *C. parapsilosis* está associado principalmente a permanência prolongada em hospitais. Além disso, essa espécie possui características que justificam sua virulência, como sua aderência seletiva a materiais protéticos e formação de biofilmes em superfícies plásticas. (BRANCHINI *et al.*, 1994; PFALLER, 1995). Indivíduos saudáveis podem apresentar *C. albicans* na boca, tubo digestivo, intestino, orofaringe, vagina e pele. Por isso, a maioria das infecções são de origem endógena, sendo dependente da resistência do hospedeiro. Assim, essa patologia é considerada como oportunística, já que em condições normais, o fungo convive pacificamente no hospedeiro, mas, diante de condições favoráveis a seu crescimento, como distúrbios da imunidade, tornam-se patogênicos e invadem tecidos. Outros fatores, como uso de medicamentos, doenças crônicas, gravidez e intervenções cirúrgicas também podem contribuir para o desenvolvimento da infecção (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

A candidíase oral pode se apresentar como uma lesão branca ou eritematosa. As lesões como candidíase pseudomembranosa e candidíase hiperplásica participam do grupo das candidíases brancas, enquanto as formas atróficas aguda, crônica, glossite romboide mediana, queilite angular e eritema gengival linear se enquadram nas candidíases eritematosas (MILLSOP; FAZEL, 2016). Assim, candidíase na mucosa oral pseudomembranosa é a

apresentação clássica popularmente conhecida como “sapinho” (ROBBINS; COTRAN, 2016). É habitualmente vista em recém-nascidos e pacientes imunocomprometidos, podendo também estar associada a inaladores de esteroides (HELLSTEIN; MAREK, 2019). Manifesta-se como placas confluentes na língua, palato duro ou mole, mucosa bucal e faringe oral, podendo haver ou não a presença de sintomas. Quando os pacientes referem sintomas, descrevem como sensação de queimação oral, mudança na percepção do paladar e tendência de sangramento fácil nos locais afetados (SHARON; FAZEL, 2010). Já a candidíase hiperplásica é uma lesão branca circunscrita ligeiramente elevada que não desaparece, e esta é a característica que a distingue como pseudomembranosa, sendo comuns em usuários de tabaco (SHARON; FAZEL, 2010; MILLSOP; FAZEL, 2016).

A candidíase atrófica aguda, por sua vez, se evidencia por manchas eritematosas, principalmente no palato, e estão ligadas ao uso de agentes terapêuticos como corticoides e antibióticos de amplo espectro que podem aumentar o risco de supercrescimento de fungos do gênero *Candida*, reduzindo a microbiota bacteriana normal. A dor é o principal dos sintomas, juntamente com queimação na boca e a sensibilidade da mucosa (MILLSOP; FAZEL, 2016). Já a candidíase atrófica crônica manifesta-se em pacientes com dentaduras, em que o fluxo salivar está inibido, tendo como clínica as lesões restritas as áreas em contato com as próteses (ARENDORF; WALKER, 1987; FARAH; LYNCH; MCCULLOUGH, 2010).

A queilite angular, também conhecida como estomatite angular, manifesta-se com fissuras nas comissuras labiais, sensibilidade e eritema (MILLSOP; FAZEL, 2016). É uma reclamação comum para usuários de dentadura, pessoas que lambem os lábios ou mordem os cantos da boca (APPLETON, 2000). Pode ainda ser observada em pacientes com deficiência de ácido fólico, ferro, riboflavina e vitamina B (ROSE, 1971).

Quando a candidíase acomete o trato genital feminino, é denominada de candidíase vulvovaginal (CVV), sendo esta ocasionada pelo crescimento anormal de fungos (ZIARRUSTA, 2002). Cerca de 75% das mulheres têm pelo menos um episódio de CVV durante toda vida. Os sinais e sintomas típicos incluem corrimento branco e grosso, ardor, vermelhidão, coceira na vulva e vagina e dispareunia. O uso de antibióticos, gravidez, diabetes mellitus não controlada, aumento dos níveis de estrogênio e roupas justas são fatores que contribuem para o desenvolvimento da infecção sintomática (SOBEL, 1997; SOBEL *et al.*, 1998; BEREK, 2014). A CVV ainda pode ser classificada como não complicada ou complicada. A primeira acontece de forma esporádica, manifestando sintomas de leves a moderados, e tem como principal agente etiológico a *C. albicans*, atingindo, principalmente, imunocompetentes.

Na segunda classificação estão as CVVs recorrentes com sintomas intensos, não causadas por *C. albicans*, acometendo principalmente mulheres imunocomprometidas (BEREK, 2014). De acordo com Fukazawa *et al.* (2019), CVV de forma recorrente afeta a mulher em múltiplos aspectos, incluindo bem-estar físico e psicológico, aspectos de relações sociais e atividade sexual.

Por fim, a candidíase cutânea afeta preferencialmente virilhas, dobras cutâneas abdominais, pele inframamária ou espaços interdigitais, locais esses que normalmente há condições de umidade e temperatura favoráveis a seu crescimento (YOSIPOVITCH *et al.*, 1993; NENOFF *et al.*, 2014). Nesse sentido, ocorre principalmente em climas tropicais e durante meses de verão. Assim como os outros padrões de manifestação da candidíase, a forma cutânea pode estar associada a diabetes mellitus e HIV. Sendo assim, infecção se manifesta por áreas eritematosas, erosivas, secas escamosas, que às vezes pode ser exsudativa e apresentar pústulas. A dermatite da fralda é uma forma especial da candidíase cutânea que acomete pacientes acamados e incontinentes, sendo marcada por maceração, erosão, manchas esbranquiçadas e descamação (NENOFF *et al.*, 2014).

2.3 Tratamento medicamentoso

O tratamento da candidíase pode ser feito por meio de medicamentos de administração oral, tópica ou até mesmo intravenosa para casos de candidíases profundamente invasivas, sendo que os principais fármacos são os derivados azólicos e os poliênicos. O tratamento tópico é realizado por meio de cremes, loções, óvulos, pomadas, tabletes vaginais, supositórios e aerossóis. Podem ser utilizados na pele e, principalmente, em mucosas, sendo bastante útil em infecções fúngicas superficiais. Ademais, em casos de candidíase vulvovaginal, o tratamento tópico é indicado como primeira opção (COSTA; FERNANDES; SILVA, 2003; BRUNTON, 2012; BRASIL, 2015).

Em relação aos poliênicos, destacam-se a Anfotericina B e a Nistatina. A Anfotericina B é um macrolídeo heptaênico e possui comportamento anfotérico devido à presença de um grupo amino primário na micosamina e um grupo carboxila no anel principal. Essa característica confere ao fármaco uma hidrossolubilidade em valores extremos de pH. Quanto ao mecanismo de ação, a Anfotericina B liga-se ao ergosterol da membrana fúngica, formando poros ou canais. Dessa forma, a permeabilidade da membrana aumenta, o que permite o fluxo de compostos essenciais para fora da célula, com consequente desbalanço osmótico e

morte celular (COSTA; FERNANDES; SILVA, 2003; BRUNTON, 2012). Esse fármaco é utilizado, primariamente, para candidíase cutânea, desde a superficial até a profundamente invasiva. Os efeitos adversos incluem febre, calafrios, taquipneia, hipotensão e nefrotoxicidade. No entanto, as reações adversas são mais observadas em administrações intravenosas (BRUNTON, 2012).

A Nistatina é um composto de estrutura e ação semelhantes à Anfotericina B, podendo ser utilizada de forma oral ou tópica. No entanto, a forma tópica é mais comum, sendo indicada para casos de candidíase vulvovaginal, orofaríngea e cutânea. Não há absorção sistêmica da Nistatina a partir de pele ou mucosas e as reações alérgicas são incomuns (COSTA; FERNANDES; SILVA, 2003; GOLAN *et al.*, 2014; BRUNTON, 2012).

Em relação aos derivados azólicos, têm-se como opção de uso tópico o butaconazol, clotrimazol, econazol, miconazol, terconazol, tioconazol e sertaconazol, sendo o miconazol indicado como primeira opção (COSTA; FERNANDES; SILVA, 2003; BRUNTON, 2012; BRASIL, 2015). Esses fármacos têm como mecanismo de ação a inibição da enzima lanosterol 14- α -desmetilase, associada ao sistema citocromo P-450, que atua sobre a molécula de lanosterol. A partir do bloqueio enzimático, há diminuição do ergosterol, o que altera a permeabilidade da membrana fúngica, além do acúmulo de compostos metilados tóxicos, levando a inibição do crescimento celular (CARRILLO-MUÑOZ *et al.*, 2006, COSTA; FERNANDES; SILVA, 2003). O miconazol, principal representante azólico para o tratamento da candidíase, é minimamente absorvido de forma sistêmica, sendo o uso seguro, inclusive, durante a gestação. Como efeitos adversos, ressaltam-se o prurido ou irritação e, mais raramente, cefaleia e exantema cutâneo (BRUNTON, 2012; BRASIL, 2015).

Além disso, tem-se também os medicamentos via oral, que normalmente são usados para candidíases de repetição. A *C. parapsilosis* se mostrou bastante sensível ao fluconazol, voriconazol e itraconazol. O Fluconazol é um bistriazol fluorado altamente específico para as enzimas dependentes do citocromo fúngico P450, sendo útil para o tratamento de candidíase não complicada. O medicamento pode ser administrado via oral em dose única de 150 mg, apresentando efeitos adversos singelos, porém, está contraindicado para grávidas, se alocando na categoria C de medicamentos que devem ser evitados durante a gestação (MARTINEZ, 2006; MOREIRA, 2010; MENEZES *et al.*, 2012).

Em casos de resistência ao antifúngico anterior, o voriconazol mostrou-se bastante eficiente, pois é um triazol com estrutura semelhante à do fluconazol, entretanto com atividade aumentada *in vitro*, espectro ampliado e hidrossolubilidade baixa. Inicialmente, sua infusão é

intravenosa de 6 mg por kg, a cada 12 horas e depois 6 mg por kg em duas doses, seguidas de 3 a 4 mg por kg, a cada 12 horas. Uma vez que, o paciente apresentou melhora, a administração se torna oral, 200 mg, a cada 12 horas, durante 3 dias, e de preferência que a ingestão do fármaco seja feita 1 hora antes ou 1 hora depois das refeições, já que alimentos ricos em gorduras diminuem sua biodisponibilidade. Seu mecanismo de ação tem como função inibir a desmetilação de 14-alfa-lanosterol mediada pelo citocromo P-450 fúngico, uma etapa essencial na biossíntese do ergosterol fúngico. Os principais efeitos adversos são hepatotoxicidade, alucinações auditivas ou visuais transitórias e reações anafilactóides, com desmaio, náuseas, rubor, estado febril e exantema, devendo o paciente interromper seu uso. Assim como o fluconazol, é contraindicado para gestantes, estando na categoria D de medicamentos contraindicados (BRASIL, 2013).

Outro imidazólico citado é o itraconazol, agente triazólico sintético, uma mistura racêmica equimolar de quatro diastereoisômeros, responsável por inibir a síntese do ergosterol em células fúngicas, é ingerido em forma de solução de 100 mg, o equivalente a 10 ml, 1 vez ao dia. Vale ressaltar sua toxicidade grave quando associado a quinidina, halofantrina, levometadila, pimizida ou cisaprida, podendo induzir arritmias cardíacas potencialmente fatais. Seus efeitos adversos podem variar de brandos (diarreia, cólicas abdominais, anorexia e náuseas) até excessivamente graves, (insuficiência hepática e insuficiência cardíaca congestiva) quando o paciente já tiver alguma comorbidade instalada. Por último e não menos importante, há o cetoconazol, um agente antifúngico que possui o mesmo mecanismo de ação do fármaco anterior. Quando utilizado para tratamento, o paciente faz a terapia com doses de 100 mg, uma vez ao dia, por 6 meses. Este antifúngico é contraindicado para grávidas, nutrízes e insuficientes hepáticos, tendo como efeitos adversos as mesmas reações adversas brandas do Itraconazol (BRUNTON, 2012; BRASIL, 2015).

2.4 Plantas medicinais em busca de novas terapias

Documentalmente, a resistência clínica foi definida como manutenção ou progresso de uma infecção, apesar da terapia antimicrobiana apropriada. Uma resposta clínica bem-sucedida à terapia antimicrobiana não depende apenas da suscetibilidade do organismo patogênico, mas também do sistema imunológico do hospedeiro, penetração e distribuição do medicamento, adesão do paciente e inexistência de um foco de infecção protegido ou persistente (por exemplo, um cateter ou abscesso), o que é uma condição verdadeira para infecções fúngicas (WHITE; MARR; BOWDEN, 1998). Os representantes resistentes à medicamentos

do gênero *Candida* e outras espécies patogênicas, ocorre muitas vezes por expressão de bombas de efluxo que reduzem o acúmulo de drogas, alteram a estrutura das proteínas ou a concentração do alvo antifúngico, e modifica a composição do esterol de membrana, entre outros mecanismos. Falhas no tratamento de pacientes e mudanças nas prevalências de espécies de *Candida* podem ser motivos da resistência aos antifúngicos (MORACE; PERDONI; BORGHI, 2014).

Além disso, devido à natureza eucariótica comum das células fúngicas e humanas, é difícil detectar metabólitos ou estruturas alvo específicas nos agentes infecciosos para ação dos antifúngicos. É necessário considerar também a condição de pacientes imunodeprimidos, seja por quimioterapias ou outras comorbidades debilitantes do sistema imune, que ficam mais suscetíveis às infecções fúngicas, e muitas vezes mais sensibilizados aos efeitos adversos do medicamento (SANGLARD; ODDS, 2002).

Devido à disponibilidade limitada de antifúngicos, há uma inevitável necessidade de aclarar fármacos com novos alvos e novos mecanismos de ação. Nesse contexto, os antifúngicos fitoterápicos e plantas medicinais têm adquirido importância no tratamento contra infecções por *Candida*. (LIMA *et al.*, 2006).

Os produtos naturais de origem vegetal são uma importante fonte de agentes antimicrobianos. Dentre esses produtos, destacam-se os óleos essenciais (OE), que são elementos voláteis contidos em muitos vegetais e estão relacionados com diversos cargos necessários à sobrevivência destes, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos, além de possuírem propriedades antifúngicas (SIANI, 2000), como no caso de Souza *et al.* (2016), que em seu estudo demonstrou que os OE contra células planctônicas e isolados clínicos de *C. tropicalis* foram ativos. Além disso, o óleo essencial de *P. graveolens* (PG-EO) inibiu todas as cepas testadas em valores de CIM consideravelmente inferiores ao valor do fluconazol, antifúngico padrão de comparação. Os principais constituintes do PG-EO foram os monoterpenos oxigenados geraniol (42,3%), linalol (20,1%), citronelol (11,1%) e mentona (8,0%) (SOUZA *et al.*, 2016).

Outro óleo essencial de origem vegetal que busca evadir aos mecanismos de resistência da *Candida* é o extraído da *Melaleuca alternifolia*, que é um arbusto pertencente ao gênero *Melaleuca*, popularmente conhecida como "árvore de chá", cujo principal produto é o óleo essencial (TTO - *teatreeoil*), de grande importância medicinal por possuir comprovada ação bactericida e antifúngica contra diversos patógenos humanos (OLIVEIRA *et al.*, 2011). A atividade antimicrobiana desse óleo essencial sobre *Candida* spp. é potente e eficaz. A atividade

antifúngica deve-se ao componente terpinen-4-ol (Isômero de terpineol e constituinte primário do óleo da árvore do chá, obtido como um extrato das folhas, galhos e casca de *Melaleuca alternifolia* Cheel). Os efeitos do óleo de *M. alternifolia* foram alcançados em uma CIM inferior a 1% e concentração fúngica mínima (CFM) inferior a 8%, demonstrando que se trata de um fármaco potente (CAVALCANTI; ALMEIDA; PADILHA, 2011).

Citrus paradisi Macfad (Toranja) é uma árvore frutífera subtropical que pertence à família *Rutaceae*. A Toranja é uma fonte rica em vitamina C, compostos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos e cumarinas) e substâncias terpênicas (como carotenoides e limonoides) (HUNG; SUH; WANG, 2017). A atividade antifúngica da Toranja foi testada por Massa *et al.* (2018), contra o crescimento de *C. glabrata*, a maioria significativa de cepas foram sensíveis ao óleo essencial de toranja, apresentando CIM entre 0,062 a 1%. Considerado um dos óleos essenciais mais eficazes contra *Cândida*, reduzindo a atividade metabólica em 10% em níveis baixos de concentração e de 60% em uma concentração mais alta, além de possuir atividade citotóxica em média potência contra as cepas (MASSA *et al.*, 2018).

2.5 *Brunfelsia uniflora*

Brunfelsia uniflora (Pohl.) D. Don - *Solanaceae* - é uma planta arbustiva encontrada em várias regiões do Brasil, Peru, Bolívia, Equador, Venezuela e Colômbia. Suas folhas são utilizadas na medicina popular como diurético, antirreumático, antissifilítico, emético e laxante (SCHULTES, 1979). Na região amazônica, é tradicionalmente utilizada como alucinógenos, anti-inflamatórios (CASTIONI; KAPETANIDIS, 1996; FILIPOWICZ; NEE; RENNER, 2012), antibacterianos, e efeitos antifúngicos (BEGUM *et al.*, 2007). Há relatos de que a planta seja utilizada como anestésica, abortiva, hipertensiva quando utilizadas em altas concentrações (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007). Análises fitoquímicas de *Brunfelsia spp.* indicaram que, em sua composição, há presença de alcaloides (RUPPELT *et al.*, 1991), benzenoides, terpenos, lactonas, lipídios (CASTIONI; KAPETANIDIS, 1996), flavonoides (BRUNNER *et al.*, 2000), saponinas esteroidais, ácidos graxos, ácido caféico (ácido clorogênico), ciclopropenoide (MARTINS *et al.*, 2009), cumarinas, sapogeninas (ICHIKI *et al.*, 1994), manaceína, manacin, esculetina e escopoletina (JORGE *et al.*, 2017).

A composição química do principal composto da oleorresina da flor de *B. uniflora* foi (E, E) – geranyl linalol, que é utilizado como aromatizante na indústria de alimentos, cosméticos e perfumes (LAPCZYNSKI *et al.*, 2008). Esse composto, por ter atividade

antiespasmódica, é utilizado contra amenorreia, reumatismo (ZRIRA *et al.*, 2008), acne, artrite, queimadura, úlceras e como expectorante e antitérmico (XIE *et al.*, 2013).

Em estudos relacionados à sua atividade antimicrobiana, houve inibição do crescimento microbiano de *C. albicans* e *S. aureus*, com concentração inibitória mínima de 125 mg/mL, e de 62,5 mg/mL para *E. Coli*. O controle positivo para bactérias (benzilpenicilina) e fungos (nistatina) inibiram o crescimento de todos os microrganismos (LINDE *et al.*, 2016). Alcaloides encontrados no extrato das folhas de *B. uniflora* podem estar envolvidos com a atividade antimicrobiana dessa planta, apresentando ação bactericida e fungicida (SCHNEIDER *et al.*, 2015). Esta classe de compostos pode inibir enzimas, responsáveis pela divisão celular, inibem a síntese de núcleos ácidos e despolarizam a membrana citoplasmática (CUSHNIE; CUSHNIE; LAMB, 2014). Os taninos apresentam atividade antisséptica, antimicrobiana e antifúngica, pois podem complexar enzimas bacterianas e fúngicas e modificar o metabolismo das membranas celulares (MONTEIRO *et al.*, 2005).

Na grande maioria das plantas, a atividade antioxidante é resultado de um grupo de substâncias em seu metabolismo, mas no caso da *B. uniflora* especula-se que essas propriedades antioxidantes são resultado das saponinas (PEREIRA; CARDOSO, 2012) e de compostos fenólicos, como taninos encontrados nas plantas da família *Solanaceae* (SCHNEIDER *et al.*, 2015). Compostos fenólicos têm a capacidade de inibir a peroxidação lipídica e a lipoxigenase devido à estrutura química e às propriedades de oxirredução com atuação no sequestro ou neutralização de radicais livres sem causar danos às estruturas celulares (SANTOS *et al.*, 2011; SCHNEIDER *et al.*, 2015).

De acordo com Jorge *et al.* (2017), a oleorresina de folhas de *B. uniflora* obtida por extração de CO₂ super crítico tem alta atividade antioxidante. A condição de extração afeta o rendimento, a composição química e a atividade antioxidante da oleorresina, que é composta por fitol e tocoferol, proveniente das folhas, e geranil linalol e alfa-amirina, obtidos das flores. Tal atividade antioxidante fornece subsídios para aplicações potenciais nas indústrias farmacêutica, alimentícia e química.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar se a planta *B. uniflora* possui atividade antiproliferativa contra células de *C. parapsilosis*.

3.2 Objetivos Específicos

- Obter extrato etanólico de *Brunfelsia uniflora*;
- Obter o rendimento do extrato etanólico bruto das folhas de *B. uniflora*;
- Avaliar a influência da *B. uniflora* contra células de *C. parapsilosis*;
- Identificar a atividade sinérgica/antagônica do extrato da *B. uniflora* com drogas tradicionalmente utilizadas no tratamento de candidíases.

4. METODOLOGIA

Foi realizado um estudo de caráter quantitativo, de abordagem indutiva, com procedimento comparativo estatístico e técnica de documentação direta em laboratório.

4.1 Coleta do material vegetal

A coleta de folhas de *B. uniflora* foi realizada na cidade de Anápolis - GO/Brasil, (coordenadas geográficas 16° 19' 43" S; 48° 57' 12" O). As amostras foram armazenadas no laboratório de Microbiologia da Universidade Evangélica de Goiás (UniEVANGÉLICA).

4.2 Obtenção dos extratos de *B. uniflora*

A obtenção dos extratos de *B. uniflora* foi realizada, de acordo com Moraes *et al.* (2010), com certas modificações, uma vez que se trata de espécies diferentes de plantas, porém de forma igualitária quanto à marcha analítica. As folhas de *B. uniflora*, secas em temperatura ambiente, foram macerados e, posteriormente, armazenados em frasco escuro contendo etanol (proporção 1:4) mantido sob refrigeração. A amostra foi filtrada e seca com auxílio de rotaevaporador. Por fim, o extrato resultante foi armazenado em um frasco âmbar ao abrigo da luz, a 4°C (COSTA, 2013).

4.3 Cultivo e manutenção do fungo

A cepa de *C. parapsilosis* ATCC (American Type Culture Collection - 22019) foi cultivada em meio Ágar Sabouraud Dextrose (Peptona 10g/L; Dextrose 40g/L; Ágar 15g/L), mantida em estufa a 36°C por 72 horas e, posteriormente, submetida a experimentação ou novo repique (MENEZES *et al.*, 2012).

4.4 Teste de sensibilidade em placas

No teste de sensibilidade em meio sólido, amostras com um número de 10^4 células de *C. parapsilosis*, em 30 mL de ágar nutriente suplementado com glicose e com três dias de crescimento, foram transferidas para placas com o mesmo meio de cultura acrescido aos extratos de *B. uniflora* em concentrações variadas.

As placas foram mantidas em incubação a 36°C durante três dias e, então, foram fotografadas, segundo Betoni *et al.* (2006), com modificações. Esse fato se deve às espécies

diferentes de microrganismos, seguindo-se os preceitos metodológicos, com exceção do tempo de cultivo antes da fotografia, sendo três dias e não, 24 horas.

4.5 Teste de sinergismo

O teste de sinergismo, consiste na preparação de placas-controle contendo os extratos de folha (250ppm) de *Brunfelsia uniflora* associados a placas-controle contendo um antifúngico derivado azólico, o fluconazol. Para avaliação da atividade sinérgica entre extratos etanólicos de folhas de *B. uniflora* em concomitância com o antifúngico, fez-se triplicatas biológicas, utilizando as mesmas concentrações dos extratos de folha, assim como do fluconazol das placas-controle.

Os testes foram feitos utilizando o fluconazol e diferentes concentrações de extrato, sendo essas concentrações de 100 µg/mL, 200 µg/mL e 400 µg/mL. Posteriormente, antes de serem fotografadas, as placas foram incubadas durante três dias a 36°C segundo Betoni *et al.* (2006), com modificações, uma vez que, se trata de espécies diferentes de microrganismos, dando sequência a mesma marcha analítica, com exceção do tempo de cultivo antes da fotografia (3 dias ao invés de 24 horas).

4.6 Teste de sensibilidade por disco de difusão

Previamente, discos de papel filtro com diâmetro de 6 mm foram embebidos nos extratos obtidos da planta em diferentes concentrações. A posteriori, fez-se inoculação de $1,5 \times 10^8$ células/mL de *C. parapsilosis* em placas de meio nutriente e, em seguida, os discos foram retirados dos tubos com uma pinça esterilizada e colocados sobre as placas contendo o meio. Além disso, as placas foram incubadas em estufa, a 36°C, por três dias e após esse período foi possível mensurar os halos de inibição do crescimento, em milímetros, com o auxílio de um paquímetro (BAUER *et al.*, 1966; WAYNE, 2002).

5. RESULTADOS

5.1 Obtenção do rendimento do extrato de *Brunfelsia uniflora*

Depois do período de secagem, as folhas de *Brunfelsia uniflora* foram pulverizadas e em seguida realizada a pesagem e o cálculo do rendimento, como apresentado no quadro 1. Desse modo, para 19,30 g de folha, o percentual de rendimento de extrato foi de 8,7%.

Quadro 1- Obtenção de extrato de *Brunfelsia uniflora*.

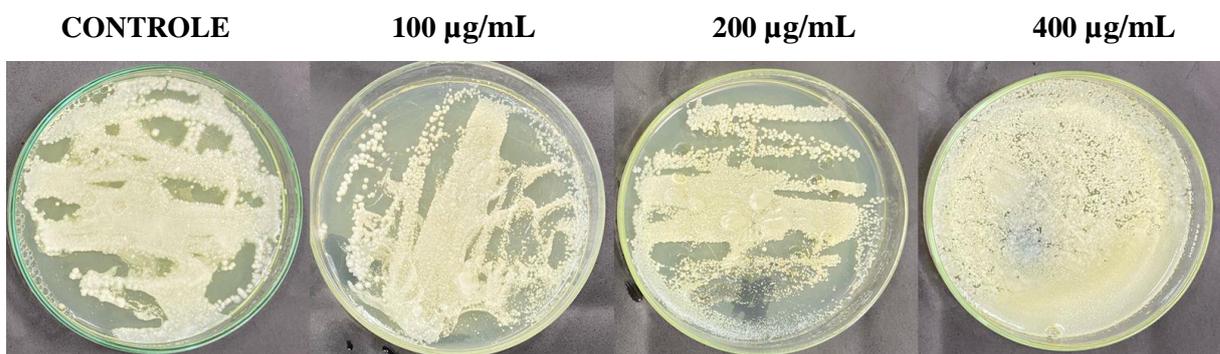
<i>Espécie</i>	<i>Extrato</i>	<i>Massa (g)</i>	<i>Extrato E (g)</i>	<i>Rendimento</i>
<i>Brunfelsia uniflora</i>	<i>Folha</i>	19,30	15,59	8,7%

EE: extrato etanólico

5.2 Teste de sensibilidade em placa

Para avaliação da influência do extrato etanólico de *B. uniflora* em *Candida parapsilosis* foi realizado o teste de sensibilidade em placa. Amostras contendo 10^4 como concentração de células fúngicas foram inoculadas em meio ágar nutriente suplementado com glicose. Extratos de *B. uniflora* nas concentrações de 100 µg/mL, 200 µg/mL e 400 µg/mL foram adicionados ao meio inoculado. Levando-se em consideração a placa controle, os resultados mostram que o crescimento de *C. parapsilosis* não foi inibido de maneira dose-dependente por nenhuma das concentrações do extrato etanólico obtido a partir da folha. Todavia, a placa em que foram adicionados 1,2 ml mostrou que a o fungo cresceu com dificuldade (Figura 1).

Figura 1 – Crescimento de *Candida parapsilosis* em ágar nutriente suplementado com extratos etanólicos da folha de *Brunfelsia uniflora* em diferentes concentrações.

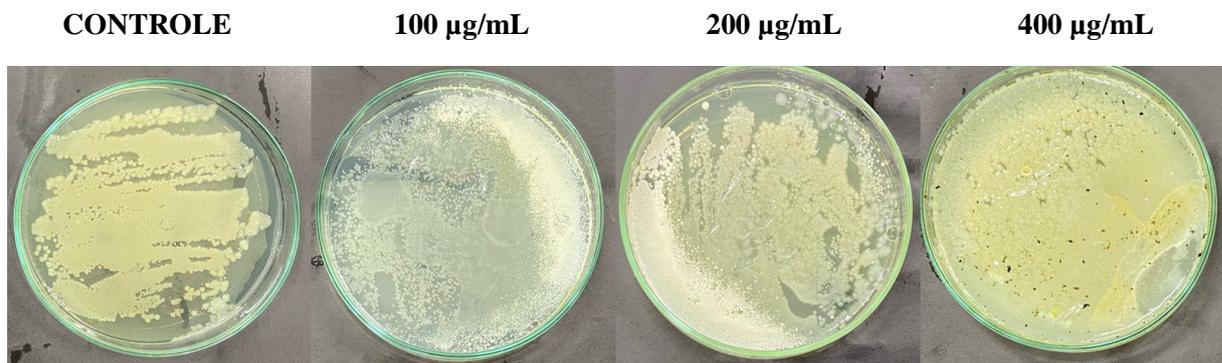


Fonte: os autores

5.3 Teste de sinergismo

O teste de sinergismo foi realizado a partir de 90 µl de fluconazol e extrato de *B. uniflora* nas concentrações de 100 µg/mL, 200 µg/mL e 400 µg/mL. A partir da observação da placa controle, contendo apenas o antifúngico, infere-se que a quantidade utilizada de fluconazol não foi suficiente para inibir o crescimento da *C. parapsilosis*. Nas demais placas, houve crescimento fúngico, mas com dificuldade, por um possível sinergismo entre o extrato vegetal e o fluconazol (Figura 2).

Figura 2 – Resultado do teste de sinergismo.



Fonte: os autores

5.4 Teste de sensibilidade por disco de difusão

O teste de sensibilidade por disco de difusão teve como objetivo avaliar a sensibilidade antimicrobiana do extrato de *Brunfelsia uniflora* sobre a *Candida parapsilosis*. A realização do experimento foi feita através de três placas contendo o meio de cultura Ágar Sabouraud, as quais foram inoculadas com células de *C. parapsilosis* e, posteriormente, foram adicionados discos de papel filtro embebidos no extrato das folhas de Manacá em diferentes concentrações. Os discos foram dispostos em três linhas horizontais, sendo que as concentrações foram de 100 µg/mL, 200 µg/mL e 400 µg/mL. As placas foram mantidas em estufa, a 36°C e, no terceiro dia, foi realizado o memorial fotográfico.

Não houve a formação de halos de inibição, nesse sentido, entende-se que nenhuma das concentrações utilizadas do extrato de *Brunfelsia uniflora* foi capaz de inibir o crescimento do fungo (Figura 3).

Figura 3 – Resultado do teste de sensibilidade por disco de difusão.



Fonte: os autores

6. DISCUSSÃO

A partir da análise dos resultados, observou-se que o uso do extrato etanólico de *Brunfelsia uniflora* não possui atividade antiproliferativa sobre a *Candida parapsilosis* nas concentrações utilizadas. Todavia, houve pequena atividade sinérgica com medicamento habitualmente utilizado em infecções fúngicas. A associação de 90 µl de fluconazol com 90 µl do extrato de *Brunfelsia uniflora*, ambas na concentração de 400 µg/mL fizeram com que a *C. parapsilosis* crescesse com dificuldade, dessa forma o rendimento de um extrato da planta foi maior que 100%.

Em comparação a outros estudos, pode-se perceber certa semelhança no rendimento obtido pela amostra. Foi alcançado um rendimento de 32,5% de extrato etanólico bruto obtido de frações das folhas de *Spiranthera odoratissima*, que apesar de ser um tipo diferente de “Manacá”, são pertencentes da mesma família (CHAIBUB, 2013). Comparando com a quantidade de 8,7% de extrato etanólico obtido neste trabalho, ao utilizar as folhas de *Brunfelsia uniflora*. Em relação à atividade contra o fungo, o mesmo autor obteve concentrações que variaram de 12,50 mg/mL a 0,098 mg/mL para o extrato etanólico de *Spiranthera odoratissima* e obteve uma boa atividade contra *C. albicans*. No entanto, a concentração de extrato de *Brunfelsia uniflora* não gerou atividade antiproliferativa sobre a *Candida parapsilosis*.

Apesar do fluconazol ter amplo espectro de ação, incluindo espécies de *Candida*, o uso aumentado desta droga deu origem ao desenvolvimento de resistência da *Candida spp.* Dentre as limitações mais importantes do fluconazol, estão referidas a sua falta de atividade contra fungos filamentosos, e a resistência natural de algumas leveduras contra este composto (SANTOS JUNIOR, 2005).

Foi utilizada como concentração máxima de extrato etanólico de *Brunfelsia uniflora* 400 µg/mL. No entanto, evidenciou-se que a concentração inibitória mínima (CIM) de extrato hidroetanólico da planta deve ser maior que 800 µg/mL para conseguir paralisar o crescimento da *C. parapsilosis* (SILVA *et al*, 2015). Porém, pela escassez de experimentos da planta em estudo com essa espécie de Cândia, não é possível confirmar a efetividade da inibição. Apesar do arsenal de experimentos ser pequeno em relação a essa espécie de planta, outros estudos como o de Pinto *et al.* (2011) sobre Glicoalcaloide antifúngicos, flavonoides e outros constituintes químicos de *Solanum asperum*, foram feitos e publicados sobre a Família *Solenaceae*, incluindo resultados sobre dois compostos retirados de plantas dessa mesma Família, que inibiu o crescimento das leveduras *C. albicans* e *C. parapsilosis*.

Ressalta-se que a disponibilidade de estudos sobre a capacidade inibitória da *Brunfelsia uniflora* em relação a *Candida parapsilosis* é escassa, dificultando o suporte para o embasamento teórico desta pesquisa. Além disso, a pesquisa foi financiada pelos próprios autores, limitando os recursos necessários para a realização dos experimentos. O laboratório utilizado pertence a uma instituição de ensino privada, estando disponível para vários acadêmicos, o que aumenta o risco de contaminação das amostras. Apesar das adversidades, a amostra não foi contaminada, e no teste de sensibilidade em placa, observou-se dificuldade de proliferação da *C. parapsilosis*, além de pequeno sinergismo associado ao fluconazol.

Após os experimentos realizados em laboratório, foi obtido um percentual de rendimento com extrato etanólico da *Brunfelsia uniflora* de 8,7% para 19,30 g de folha. Em relação a atividade da *Candida parapsilosis*, pode-se concluir que não houve inibição. Entretanto, verificou-se atividade sinérgica quando associado ao fluconazol, medicamento tradicionalmente utilizado contra infecções fúngicas.

7. CONCLUSÃO

Foram realizados teste de sensibilidade em placa, de sinergismo e de sensibilidade por disco de difusão para avaliar a atividade antiproliferativa da *Brunfelsia uniflora* contra *C. parapsilosis*.

De acordo com os resultados obtidos foi possível observar que nenhuma das concentrações testadas do extrato da planta foi capaz de inibir o crescimento de *Candida parapsilosis* de forma efetiva. No entanto, o ponto mais forte desse estudo é que o extrato etanólico da planta possui atividade sinérgica associado ao fluconazol.

Outro auge da pesquisa, é que a mesma serve como embasamento teórico para que estudiosos e cientistas, realizem mais experimentos com essa planta. Uma vez que, há a possibilidade de que o extrato etanólico de *Brunfelsia uniflora* em concentrações maiores possa inibir o crescimento da *C. parapsilosis*. Além disso, caso o estudo seja prosseguido e as futuras conclusões não sejam satisfatórias, será sabido pelos interessados, que esta planta em nada auxilia no tratamento das candidíases causadas por esse fungo, o que fará desnecessário mais análises laboratoriais acerca da planta como possível tratamento para as candidemias.

O tratamento medicamentoso tradicional vem apresentando cada vez mais resistência, tornando-se necessário a busca por novas alternativas. O estudo em questão apresenta-se, portanto, como mais um passo para novas opções de tratamento, e é necessário que os próximos testes realizados sejam feitos com maiores concentrações do extrato da planta.

Entretanto, os pontos fracos do trabalho foi o que mais limitou o desenvolvimento do estudo e um possível resultado mais satisfatório. Porquanto, dentre as limitações, destacam-se a falta de recursos financeiros, a dificuldade de acesso que a instituição de ensino interpôs para a utilização dos laboratórios, a pouca disponibilidade de tempo que as acadêmicas tiveram, a troca de orientador que este grupo sofreu no decorrer da pesquisa e a falta de um profissional experiente e capacitado nessa área para acompanhar os experimentos em laboratório.

Sendo assim, a implicação de destaque é a necessidade de que haja mais estudos em ambiente controlado, monitorado e com auxílio de profissionais com uma maior expertise no assunto. Sugere-se então, que os pesquisadores ou estudiosos que tiverem interesse em continuar os experimentos com essa planta em relação ao tratamento da *C. parapsilosis*, utilizem maiores concentrações de extrato etanólico de *Brunfelsia uniflora*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA, M. D. F.; FREITAS, P. F. D.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

AGUIAR, M. M. G. B. **Desenvolvimento de Novos Comprimidos Bucais de Nistatina para o Tratamento de Candidíase Oral**. 2007. 146 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

APPLETON, S. S. Candidiasis: pathogenesis, clinical characteristics, and treatment. **Journal of the California Dental Association**, v. 28, n. 12, p. 942-948, 2000.

ARENDORF, T. M.; WALKER, D. M. Denture Stomatitis: a review. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 14, n. 3, p. 217-227, 1987.

BAUER, A. W. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am J. clin. Pathol.**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BEGUM, R. *et al.* Preliminary antimicrobial activity and cytotoxicity of *Brunfelsia latifolia*. **Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 65-67, 2007.

BEREK, J. S. Berek e Novak: **Tratado de Ginecologia**. 15ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2014.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 2, 2004.

BETONI, J. E. C. *et al.* Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 4, p. 387-390, 2006.

BONASSOLI, L. A.; BERTOLI, M.; SVIDZINSKI, T. I. E. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. **Journal of Hospital Infection**, v. 59, n. 2, p. 159-162, 2005.

BRANCHINI, M. L. *et al.* Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 452-456, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Bulário eletrônico Anvisa**, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis**. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

BRUNNER, G. *et al.* A novel acylated flavonol glycoside isolated from *Brunfelsia grandiflora* ssp. *grandiflora*. Structure elucidation by gradient accelerated NMR spectroscopy at 14T.

Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques, v. 11, n. 1, p. 29-33, 2000.

BRUNTON, L. L. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12. ed. Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 2012.

CALDERONE, R. A. Introduction and historical perspectives. *Candida and Candidiasis*, v. 1, p. 3-13, 2002.

CALDERONI, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v. 9, p. 327-35, 2001.

CAPPELLETY, D.; EISELSTEIN-MCKITRICK, K. The echinocandins. **Pharmacother**, v. 27, n. 4, p. 369-88, 2007.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J. *et al.* Antifungal agents: mode of action in yeast cells. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 19, n. 2, p. 130-9, 2006.

CASTIONI, P.; KAPETANIDIS, I. Volatile constituents from *Brunfelsia grandiflora* ssp. *grandiflora*: qualitative analysis by GC-MS. **Scientia Pharmaceutica**, v. 64, n. 1, p. 83-91, 1996.

CAVALCANTI, Y. W.; ALMEIDA, L. D. F. D. D.; PADILHA, W. W. N. Screening of essential oils' antifungal activity on *Candida* strains. **Odontologia Clínica-Científica (Online)**, v. 10, n. 3, p. 243-246, 2011.

CHAIBUB, B. A. *et al.* Composição química do óleo essencial e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial, extrato etanólico bruto e frações das folhas de *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hil. **Revista Brasileira de Plantas Medicináveis**, v. 15, p. 225-229, 2013.

CHASSOT, F. *et al.* Activity of antifungal agents alone and in combination against echinocandin-susceptible and-resistant *Candida* parapsilosis strains. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 36, n. 1, p. 44-47, 2019.

COLOMBO, A. L. *et al.* Epidemiology of candidemia 376 in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven 377 medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, p. 2816-2823, 2006.

COLOMBO, A.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, V. 36, n.5, p.599-607, 2003.

COSTA, F. I. B. **Caracterização e avaliação da atividade antioxidante de farinhas produzidas a partir dos resíduos de Umbu (*Spondias tuberosa* Arruda Cam.) e Maracujá do Mato (*Passiflora cincinnata* Mast.)**. Dissertação de Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais-Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Bahia, 2013.

COSTA, M.; FERNANDES, O. F. L.; SILVA, M. R. R. Candidiase vulvovaginal: aspectos clínicos, tratamento oral com azólicos e suscetibilidade in vitro. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 32, n. 2, p. 145-162, 2003.

CUSHNIE, T. P. T.; CUSHNIE, B.; LAMB, A. J. A.: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 5, p. 377-386, 2014.

DIEZMANN, S. *et al.* Phylogene and Evolution of Medical Species of *Candida* and Related Taxa: a Multigenic Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n.12, p. 5624-5635, 2004.

DONLAN, R. M.; COSTERTON. J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p.167-193, 2002.

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

FARAH, C. S.; LYNCH, N.; MCCULLOUGH, M. J. Oral fungal infections: an update for the general practitioner. **Australian Dental Journal**, v. 55, p. 48-54, 2010.

FERREIRA, M. E. S.; CANELA, H. M. S.; CARDOSO, B. Avaliação fenotípica e genotípica de isolados do complexo *Candida parapsilosis* causadores de candidemia no hospital das clínicas da faculdade de medicina de ribeirão preto (HC-FMRP). **Biomedicina e Farmácia: Aproximações 2**, ed. Atenas, Cap. 15, p. 152, 2019.

FIDEL, P. L.; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 80-96, 1999.

FILIPOWICZ, N.; NEE, M. H.; RENNER, S. S. Description and molecular diagnosis of a new species of *Brunfelsia* (Solanaceae) from the Bolivian and Argentinean Andes. **PhytoKeys**, n. 10, p. 83, 2012.

FLEVARI, A. *et al.* Treatment of invasive candidiasis in the elderly: a review. **Clinical Interventions in Aging**, v. 8, p. 1199, 2013.

FOCACCIA, R., VERONESI, R. **Tratado de infectologia**. 5ª ed. Revista e atualizada. Editor científico Roberto Focaccia.: Editora Atheneu, 2015.

FUKAZAWA, E. I. *et al.* Influence of recurrent vulvovaginal candidiasis on quality of life issues. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 300, n. 3, p. 647-650, 2019.

GOLAN, D. E. *et al.* **Princípios de farmacologia - A base fisiopatológica da farmacoterapia**. 3. ed. Editora Guanabara Koogan, 2014.

GOVENDER, N. P. *et al.* Emergence of azole-resistant *Candida parapsilosis* causing bloodstream infection: results from laboratory-based sentinel surveillance in South Africa. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 7, p. 1994-2004, 2016.

- GULLU, A. *et al.* *Candida parapsilosis* tricuspid native valve endocarditis: 3-year follow-up after surgical treatment. **Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery**, v.7, p. 513-514., 2008.
- HAHN, R. C. *et al.* Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and in vitro resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. **Mycoses**, v. 46, n. 8, p. 324-329, 2003.
- HELLSTEIN, J. W.; MAREK, C. L. Candidiasis: red and white manifestations in the oral cavity. **Head and Neck Pathology**, v. 13, n. 1, p. 25-32, 2019.
- HUNG, W. L.; SUH, J. H.; WANG, Y. Chemistry and health effects of furanocoumarins in grapefruit. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, n. 1, p. 71-83, 2017.
- ICHIKI, H. *et al.* Studies on the constituents of *Brunfelsia hopeana* Benth. **Pharmacognosy magazine**, v. 48, n. 4, p. 314-316, 1994.
- JORGE, L. F. *et al.* Antioxidant activity and chemical composition of oleoresin from leaves and flowers of *Brunfelsia uniflora*. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 3, 2017.
- KOCSUBÉ, S. *et al.* Occurrence and genetic variability of *Candida parapsilosis* sensu lato in Hungary. **Journal of Medical Microbiology**. v.56, p. 190-195, 2007.
- KRCMERY, V.; BARNES, A. J. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **Journal of Hospital Infection**, v. 50, n.4, p. 243-260, 2002.
- LAFFEY, S. F.; BUTLER, G. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. **Microbiology**. V.151, p.1073-1081, 2005.
- LAPCZYNSKI, A. *et al.* Fragrance material review on geranyl linalool. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 11, p. S176-S178, 2008.
- LARONE, D. H. **Medically important fungi - A guide to identification**. 4. ed. Washington, American Society for Microbiology Press, 2002.
- LIMA, I. D. O. *et al.* Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.
- LINDE, G. A. *et al.* Antifungal and antibacterial activities of *Petroselinum crispum* essential oil. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 3, 2016.
- LOGUE M. E. *et al.* A genome sequence survey shows that the pathogenic yeast *Candida parapsilosis* has a devective MTL_{a1} allele at its mating type locus. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 6, p. 1009-1017, 2005.
- MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 5, p. 449-460, 2006.
- MARTINS, M. B. G. *et al.* Anatomical, chemical and antibacterial characterization of leaves of *Brunfelsia uniflora* (manacá) in the Atlantic Rainforest (Mata Atlântica). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1A & 1B, p. 106-114, 2009.

- MASSA, N. *et al.* Antifungal activity of essential oils against azole-resistant and azole-susceptible vaginal *Candida glabrata* strains. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 647-663, 2018.
- MENEZES, E. A. *et al.* Identificação molecular e suscetibilidade antifúngica de *Candida parapsilosis* isoladas no Ceará, Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 6, p. 415-420, 2012.
- MILLSOP, J. W.; FAZEL, N. Oral candidiasis. **Clinics in Dermatology**, v. 34, n. 4, p. 487-494, 2016.
- MONTEIRO, J. M. *et al.* Tannins: from chemistry to ecology. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.
- MORACE, G.; PERDONI, F.; BORGHI, E. Antifungal drug resistance in *Candida* species. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 2, n. 4, p. 254-259, 2014.
- MORAES, T.M.S. *et al.* Antimycobacterial activity and alkaloid prospection of *Psychotria* species (Rubiaceae) from the Brazilian Atlantic Rainforest. **Planta medica**, v. 77, n. 09, p. 964-970, 2010.
- MOREIRA, M. I. M. C. G. Azóis: farmacologia e interações medicamentosas. **Universidade Fernando Pessoa**, Trabalho de Conclusão de Curso, Porto, 2010.
- NENOFF, P. *et al.* Mycology—an update part 2: dermatomycoses: clinical picture and diagnostics. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 12, n. 9, p. 749-777, 2014.
- ODDS, F. C. *et al.* One year prospective survey of *Candida* bloodstream infections in Scotland. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 1066-75, 2007.
- OLIVEIRA, A. C. M. *et al.* Use of *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) oil in dentistry: perspectives on its use as alternative antimicrobial to infectious diseases of oral origin. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 4, p. 492-9, 2011.
- PAIS, C. *et al.* Genotipagem de *Candida parapsilosis* com marcadores de DNA microssatélite: uma ferramenta para o estudo e controlo das infeções hospitalares. **O Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge**, artigos breves n.8. 2014.
- PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. D. G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.
- PFALLER, M. A. Epidemiology of candidiasis. **Journal of Hospital Infection**, v. 30, p. 329-338, 1995.
- PFALLER, M. A. *et al.* *Candida* bloodstream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 561-566, 2011.

PINTO, F. C. L. *et al.* Glicoalcaloides antifúngicos, flavonoides e outros constituintes químicos de *Solanum asperum*. **Quimica Nova**, v. 34, p. 284-288, 2011.

PLOWMAN, T. Brunfelsia in Ethnomedicine. **Botanical Museum Leaflets, Harvard University**, v. 25, p. 289-319, 1997.

REZENDE H. A., COCCO M. I. M. A. utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Revista Escola Enfermagem USP**, v. 3, n. 36, p. 282-288, 2002.

ROBBINS; COTRAN. **Bases Patológicas das Doenças**. 9 ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2016.

ROSE, J. A. Folic-acid deficiency as a cause of angular cheilosis. **The Lancet**, v. 298, n. 7722, p. 453-454, 1971.

RUPPELT, B. M. *et al.* Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom: I. Analgesic and anti-inflammatory activities. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 203-205, 1991.

SADEGHI, G. *et al.* Emergence of non-*Candida albicans* species: epidemiology, phylogeny and fluconazole susceptibility profile. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 28, n. 1, p. 51-58, 2018.

SAN MIGUEL, L. G. *et al.* Secular trends of candidemia in a large tertiary-care hospital from 1988 to 2000: emergence of *Candida parapsilosis*. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 26, n. 6, p. 548-52, 2005.

SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 73-85, 2002.

SANTOS JUNIOR, I. D. D. *et al.* Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. **Scientia Medica**, v. 15, n. 3, p. 189-197, 2005.

SANTOS, R. M. *et al.* Variação sazonal nos teores de fenóis de folhas de *Eugenia uniflora* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 85-89, 2011.

SCHNEIDER, A. L. S. *et al.* Caracterização química e atividade biológica de extratos aquosos de *Brunfelsia cuneifolia* JA Schmidt (*Solanaceae*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 1103-1111, 2015.

SCHULTES, R. E. *Solanaceous* hallucinogens and their role in the development of New World cultures. **Linnean Society Symposium Series**. 1979.

SGARBI, D. B. G.; BARBAREDO, L. S. Candidíase. **DST - Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.

SHARON, V.; FAZEL, N. Oral candidiasis and angular cheilitis. **Dermatologic Therapy**, v. 23, n. 3, p. 230-242, 2010.

SHEIKH, N. *et al.* Antifungal drug resistance in *Candida* species. **European Journal of General Medicine**, v. 10, n. 4, p. 254-8, 2013.

SIANI, A. C. *et al.* Óleos essenciais: potencial antiinflamatório. 2000.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. 1 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004.

SILVA, L. I. *et al.* **Avaliação da atividade antimicrobiana, antioxidante e análise fitoquímica preliminar de plantas medicinais utilizadas pelas populações da região do Vale do Juruena e microrregião no Norte Araguaia, Mato Grosso, Brasil**. 2015. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso. 2015.

SINGARAVELU, K.; GÁCSEER, A.; NOSANCHUK, J. D. Genetic determinants of virulence–*Candida parapsilosis*. **Revista iberoamericana de micología**, v. 31, n. 1, p. 16-21, 2014.

SOBEL, J. D. *et al.* Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 178, n. 2, p. 203-211, 1998.

SOBEL, J. D. Vaginitis. **England Journal of Medicine**, v. 337, n. 26, p. 1896-1903, 1997.

SOUZA, C. M. Cury *et al.* Antifungal activity of plant-derived essential oils on *Candida tropicalis* planktonic and biofilms cells. **Sabouraudia**, v. 54, n. 5, p. 515-523, 2016.

TEIXEIRA, A. F. R. *et al.* Leveduras do gênero *Candida* isoladas de sítios anatomicamente distintos de profissionais militares em Cuiabá (MT), Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 675-80, 2011.

THOMAZ, D. Y. *et al.* An azole-resistant *Candida parapsilosis* outbreak: clonal persistence in the intensive care unit of a Brazilian teaching hospital. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2997, 2018.

TÓTH, R. *et al.* *Candida parapsilosis*: from Genes to the Bedside. **Clinical Microbiology Reviews**, 2019

TRABULSI L. R.; ALTERTHUM F. **Microbiologia**. 6.ed. São Paulo, Atheneu, 2015.

TROFA, D.; GACSER U. M. A; NOSANCHUK J. D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v.21, p. 606-625, 2008.

VAN ASBECK, E. C. *et al.* *Candida parapsilosis* fungemia in neonates: genotyping results healthcare workers hands as source, and review of published studies. **Mycopathologia**, v. 171, n.1, p 11-21, 2001.

WAYNE, P. A. National committee for clinical laboratory standards. **Performance standards for antimicrobial disc susceptibility testing**, v. 12, p. 01-53, 2002.

WEBER, K. *et al.* Secretion of E, E-Farnesol and biofilm formation in eight different *Candida* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n.5, p. 1859-1861, 2008.

WEEMS, J. J. *Candida parapsilosis*: Epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 14, p. 756-766, 1992.

WHITE, T. C.; MARR, K. A.; BOWDEN, R. A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, p. 382-402, 1998.

XIE, J. L. *et al.* Elucidating drug resistance in human fungal pathogens. **Future Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 523-542, 2014.

XIE, Z. *et al.* The GC/MS analysis of volatile components extracted by different methods from *Exocarpium Citri Grandis*. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2013, 2013.

YAMAMOTO, D. T. **Complexo *Candida parapsilosis*: identificação molecular das espécies, análise proteômica dos biofilmes por MALDI-TOF MS e investigação de um surto envolvendo isolados clínicos resistentes aos azólicos**. Biblioteca Digital da Universidade de São Paulo, teses de Doutorado, São Paulo, 2018.

YOSIPOVITCH, G. *et al.* Skin surface pH in intertriginous areas in NIDDM patients: possible correlation to candidal intertrigo. **Diabetes Care**, v. 16, n. 4, p. 560-563, 1993.

ZACCHINO, S. Estratégia para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: YUNES, R.A. E CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos. p. 435-479, 2001.

ZIARRUSTA, G. B. Vulvovaginitis Candidiasica. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 19, n. 1, p. 22-4, 2002.

ZRIRA, S. *et al.* Isolation of Moroccan Ammi visnaga oil: comparison between hydrodistillation, steam distillation and supercritical fluid extraction. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 11, n. 1, p. 30-35, 2008.