

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA  
E DO AMBIENTE

**ATIVIDADE ANTI-CANDIDA E PROPRIEDADES TOXICOLÓGICAS  
DO EXTRATO VEGETAL BRUTO DE *Tripodanthus acutifolius***

VALÉRIA LOUZADA LEAL

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria  
Co-orientadora: Prof. Dra. Chana de Medeiros da Silva

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil  
Março/2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA  
E DO AMBIENTE

**ATIVIDADE ANTI-CANDIDA E PROPRIEDADES TOXICOLÓGICAS  
DO EXTRATO VEGETAL BRUTO DE *Tripodanthus acutifolius***

Valéria Louzada Leal  
Bacharel em Ciências Biológicas

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil  
Março/2018

### CIP - Catalogação na Publicação

Leal, Valéria Louzada  
ATIVIDADE ANTI-CANDIDA E PROPRIEDADES  
TOXICOLÓGICAS DO EXTRATO VEGETAL BRUTO DE  
Tripodanthus acutifolius / Valéria Louzada Leal. --  
2018.

62 f.

Orientador: Alexandre Meneghello Fuentefria.

Coorientador: Chana de Medeiros da Silva.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Agente antifúngico. 2. Candida spp. 3.  
Tripodanthus acutifolius. 4. Fluconazol. 5.  
Sinergismo. I. Fuentefria, Alexandre Meneghello,  
orient. II. da Silva, Chana de Medeiros, coorient.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Ao Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentesfria pela orientação, confiança e por me permitir fazer parte do seu grupo de pesquisa, embora de forma não tão presente quanto eu gostaria. Muito obrigada por ter confiado no meu potencial e por minha introdução ao universo da Microbiologia Aplicada, onde acredito ter encontrado realização profissional e pessoal.

À Prof. Dra. Chana de Medeiros da Silva pela orientação, dedicação e incentivo.

À Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC) pela parceria, em especial ao meu gestor, Fernando José Stanck, pela compreensão, confiança e incentivo.

Às meninas do Laboratório de Micologia Aplicada da UFRGS, em especial à Gabriela (querida Gabi!) pela disponibilidade, ensinamentos, paciência e dedicação.

À Jocele Soares, dos Laboratórios de Cromatografia da UNISC, pela disponibilidade e dedicação, em especial à Prof. Dra. Rosana de Cássia de Souza Schneider pelos ensinamentos, pelo exemplo de dedicação profissional e disponibilidade em cooperar na minha formação.

À Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), em especial a Mariele Kliemann pela disponibilidade e auxílio no que envolvia cultivo celular, especialmente à amizade construída ao longo deste período.

Ao Instituto Federal Catarinense, em especial ao Prof. Dr. Mário Lettieri Teixeira, pela contribuição com os ensaios toxicológicos.

A todos os professores e alunos atuantes no nosso querido “Bloco 55”, pela compreensão e conversas que contribuíram imensamente no desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu namorado Frederico pelo suporte, incentivo, compreensão, parceria e confiança depositada em mim. Agradeço-te pelo pensamento estratégico e objetivo, que por muitas vezes me colocaram nos eixos e me nortearam para uma melhor execução deste trabalho (assim como na vida).

Aos familiares e amigos, pelo suporte, compreensão, por acreditarem e torcerem pela minha realização.

Aos demais amigos e parceiros, agradeço sinceramente.

## ATIVIDADE ANTI-CANDIDA E PROPRIEDADES TOXICOLÓGICAS DO EXTRATO VEGETAL BRUTO DE *Tripodanthus acutifolius*

Autor: Valéria Louzada Leal<sup>1</sup>

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentesfria

Co-orientadora: Prof. Dra. Chana de Medeiros da Silva

Compostos azólicos têm sido amplamente utilizados no controle de fungos patogênicos e fitopatogênicos, contribuindo para o surgimento de resistência e tornando a disponibilidade do arsenal antifúngico cada vez mais escasso. Além disso, a resistência adquirida por estes microrganismos requer doses cada vez mais elevadas destes agentes antifúngicos, o que pode implicar em maior toxicidade ao organismo hospedeiro. Assim, a prospecção de novas substâncias com propriedades antifúngicas e baixa toxicidade torna-se essencial. Em geral, as plantas constituem um arsenal valioso para a descoberta de novas substâncias, como *Tripodanthus acutifolius* (Loranthaceae), planta amplamente distribuída na América do Sul e extensivamente utilizada na medicina popular com reportada atividade antimicrobiana, antiinflamatória, analgésica, antipirética e diurética. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do extrato metanólico bruto (EMB) das folhas de *T. acutifolius* contra os isolados de *Candida*, bem como avaliar seu perfil toxicológico e fitoquímico. O EMB foi obtido por extração em Soxhlet e sua atividade antifúngica foi avaliada através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a capacidade de interação com o fármaco fluconazol (FLC), através do ensaio de *checkerboard*, contra isolados de *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. O perfil toxicológico foi avaliado através da determinação da viabilidade celular sobre queratinócitos humanos, além da determinação do grau de irritação de mucosa e avaliação histopatológica de dano tecidual. Paralelamente aos testes farmacológicos, foi realizada Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para identificar os metabólitos constituintes deste extrato vegetal. O EMB de *T. acutifolius* apresentou atividade antifúngica contra as diferentes espécies de *Candida* com valores de CIM variando de 16 a 64 µg/mL, onde quatro isolados leveduriformes exibiram valores mais baixos do que os apresentados pelo FLC. Ao comparar os valores de CIM apresentados somente pelo FLC com aqueles exibidos após a combinação entre FLC e o EMB, observou-se uma diminuição destes valores, onde  $p=0,02744$  demonstrou diferença significativa entre os tratamentos, sugerindo uma contribuição do EMB para uma melhor eficiência da droga sintética. Quanto ao perfil toxicológico, o teste de viabilidade celular apresentou não citotoxicidade ou fraca citotoxicidade em concentrações que variaram de 1 a 64 µg/mL, valores estes que abrangem a faixa de concentração com atividade anti-*Candida*. Além disso, a avaliação do grau de irritação de mucosa e a avaliação histopatológica não indicaram irritação e lesões teciduais em todas as concentrações medidas. Através da avaliação do perfil fitoquímico por CLAE, foi possível identificar quatro compostos fenólicos no EMB: ácido gálico, catequina, quercetina e rutina, sugerindo a contribuição destes compostos para essas propriedades. Este estudo não apresenta precedentes e sugere que o EMB das folhas de *T. acutifolius* constitui fonte promissora para o desenvolvimento de agentes anti-*Candida*.

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (62 p). Março, 2018.

# ANTI-CANDIDA ACTIVITY AND TOXICOLOGICAL PROPERTIES OF *Tripodanthus acutifolius* CRUDE VEGETABLE EXTRACT

Author: Valéria Louzada Leal<sup>1</sup>

Advisor: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Co-advisor: Prof. Dra. Chana de Medeiros da Silva

Azole compounds have been widely used to control pathogenic and phytopathogenic fungi, contributing for the rise in the fungi resistance and reducing the availability of the antifungal arsenal. In addition, the resistance acquired by these microorganisms require higher doses of these antifungal agents, which may imply in a greater toxicity in the host's organism. Therefore, the prospection of a new substance with antifungal and low toxicity properties becomes essential. In general, plants are a valuable arsenal for the discovery of new substances, such as *Tripodanthus acutifolius* (Loranthaceae), which is widely distributed in South America and extensively used by folk medicine with reported antimicrobial, anti-inflammatory, analgesic, antipyretic and diuretic activities. In this context, the present study aimed to evaluate *in vitro* antifungal activity of crude methanolic extract of *T. acutifolius* leaves against *Candida* isolates, as well to evaluate the toxicological and phytochemical profile. The crude methanolic extract was obtained by extracting *Soxhlet* and its antifungal activity was evaluated by the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the ability to interact with the drug fluconazole (FLC), through the *checkerboard* assay, against *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* strains. The toxicological profile was evaluated through the determination of cell viability on human keratinocytes, as well as through the determination of the degree of mucosal irritation and histopathological evaluation on tissue damage. In parallel of pharmacological tests, High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) was performed to identify the metabolites constituent of this plant extract. The crude methanolic extract of *T. acutifolius* presented antifungal activity against the *Candida* species, with MIC values ranging from 16 to 64 µg/mL, where four yeast isolates presented lower values than those presented by FLC. When comparing the MIC values, presented only by the FLC with those presented after the combination between FLC and the crude extract, a decrease of these values was observed, where  $p = 0.02744$  showed a significant difference between the treatments, suggesting a contribution of the crude extract to a better efficiency of the synthetic drug. Regarding the toxicological profile, the cell viability assay presented no cytotoxicity or weak cytotoxicity at concentrations ranging from 1 to 64 µg / mL, same ranges than those with anti-*Candida* activity. The assays for evaluation of the degree of mucosal irritation and the assay to evaluate tissues damage indicated no irritation and no tissue lesions in all measured concentrations. Through the evaluation of the phytochemical profile by HPLC, it was possible to identify four phenolic compounds in the crude methanolic extract: gallic acid, catechin, quercetin and rutin, suggesting their contribution for these properties. This study is unprecedented and suggests that the crude methanolic extract of the leaves of *T. acutifolius* is a promising source for the development of anti-*Candida* agents.

<sup>1</sup> Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (62 p). March, 2018.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>3</b>
	2.1 Objetivo geral	3
	2.2 Objetivos específicos	3
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>4</b>
	3.1 Aspectos gerais do gênero <i>Candida</i>	4
	3.1.1 <i>Candida albicans</i>	6
	3.1.2 <i>Candida glabrata</i>	7
	3.1.3 <i>Candida krusei</i>	8
	3.1.4 <i>Candida parapsilosis</i>	8
	3.1.5 <i>Candida tropicalis</i>	9
	3.2 Epidemiologia das espécies	9
	3.3 Resistência microbiana	11
	3.4 Plantas medicinais	14
	3.5 O gênero <i>Tripodanthus</i>	15
	3.5.1 <i>Tripodanthus acutifolius</i> (Ruiz & Pav.) Tiegh	16
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>21</b>
	4.1 Local de realização da pesquisa	21
	4.2 Coleta, preparo do material vegetal e obtenção do extrato	21
	4.3 Ensaio microbiológicos	23
	4.3.1 Seleção dos microrganismos	23
	4.3.2 Preparação dos inóculos	23
	4.3.3 Preparação das substâncias antifúngicas	24
	4.3.4 Concentração Inibitória Mínima (CIM)	24
	4.3.5 Ensaio checkerboard	26
	4.4 Ensaio toxicológicos	28
	4.4.1 Avaliação da viabilidade celular	28
	4.4.1.1 Seleção da linhagem celular	28
	4.4.1.2 Preparação da substância	28
	4.4.1.3 Cultivo Celular	28
	4.4.1.4 Tratamento das células	28
	4.4.2 Avaliação do grau de irritação de mucosa	29
	4.4.2.1 Ensaio HET-CAM	29
	4.4.3 Avaliação de dano tecidual	30
	4.4.3.1 Ensaio histopatológico	30
	4.5 Avaliação Fitoquímica	31
	4.6 Estatística	32
	4.7 Descarte de resíduos	32
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>33</b>
	5.1 Ensaio microbiológicos	33
	5.1.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e <i>checkerboard</i>	33
	5.2 Ensaio toxicológicos	36
	5.2.1 Viabilidade celular	36
	5.2.2 Ensaio HET-CAM	37
	5.2.3 Ensaio histopatológico	38
	5.3 Avaliação fitoquímica	38
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>42</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>49</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>50</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>61</b>



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Isolados leveduriformes selecionados para realização do estudo .....	23
<b>Tabela 2.</b> <i>Breakpoints</i> para definição do fenótipo de suscetibilidade dos isolados frente ao fluconazol .....	25
<b>Tabela 3.</b> Classificação dos tipos de interação entre substâncias antimicrobianas...	28
<b>Tabela 4.</b> Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) obtidos pelo FLC e pelo EMB de <i>T. acutifolius</i> quando testados separadamente e caracterização do perfil de suscetibilidade .....	33
<b>Tabela 5.</b> Novos valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) obtidos para o FLC e o EMB de <i>T. acutifolius</i> após a combinação entre os mesmos, com respectivos valores de Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) e tipos de interação .....	34

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diferentes morfologias que podem ser apresentadas por algumas espécies do gênero <i>Candida</i> .....	4
<b>Figura 2.</b> Ciclo de formação de biofilme em <i>C. albicans</i> .....	6
<b>Figura 3.</b> <i>Tripodanthus acutifolius</i> (Ruiz & Pav.) Tiegh .....	17
<b>Figura 4.</b> Estrutura química do tripodantosídeo (4-(3',4'-dihidroxifenil)-2-R-butanol-2-O-β-d-lucopiranosídeo) .....	19
<b>Figura 5.</b> Fluxograma esquemático do delineamento da pesquisa .....	21
<b>Figura 6.</b> Exemplar selecionado para coleta, <i>Tripodanthus acutifolius</i> parasitando <i>Ligustrum lucidum</i> .....	22
<b>Figura 7.</b> Microdiluição seriada para avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do EMB de <i>T.acutifolius</i> .....	25
<b>Figura 8.</b> Ensaio de <i>checkerboard</i> para determinação do tipo de interação entre a substância sintética e o extrato vegetal bruto .....	27
<b>Figura 9.</b> Comparação entre a média das CIM obtidas quando substâncias testadas separadamente e após as mesmas serem testadas em combinação .....	35
<b>Figura 10.</b> Relação dose-resposta do EMB de <i>T. acutifolius</i> no ensaio para avaliação da viabilidade celular em linhagem HaCat no período de 24 horas .....	36
<b>Figura 11.</b> Relação dose-resposta do EMB de <i>T. acutifolius</i> no ensaio para avaliação do grau de irritação de mucosa (HET-CAM) .....	37
<b>Figura 12.</b> Avaliação do dano tecidual através de ensaio histopatológico em células epidérmicas suínas tratadas com o EMB de <i>T. acutifolius</i> .....	38
<b>Figura 13.</b> Cromatogramas evidenciando os tempos de retenção, sobreposição com os padrões de referência e máximos de absorção no UV para cada composto identificado no EMB de <i>T. acutifolius</i> .....	39
<b>Figura 14.</b> Cromatograma, espectros de absorção no UV e tempos de retenção dos padrões referência .....	40
<b>Figura 15.</b> Espectro infravermelho da fração metanólica isolada a partir de cromatografia de coluna de fase normal, com respectivas bandas de absorção .....	41

## LISTA DE EQUAÇÕES

- Equação 1.** Cálculo para determinação do Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) ..... 27
- Equação 2.** Cálculo para obtenção dos percentuais de viabilidade celular, de acordo com os valores de absorvância obtidos para cada amostra ..... 29
- Equação 3.** Cálculo para determinação do escore de irritação (IS) ..... 30

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aids	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standard Institute</i>
DAD	Detector de Arranjo de Diodo
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EMB	Extrato Metanólico Bruto
FLC	Fluconazol
HaCaT	Linhagem de Queratinócito Humano Imortalizado
HET-CAM	<i>Hens Egg Test- Chorion Allantoide Membrane</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionária
IS	<i>Irritation Score</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Meticilina
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
nm	Nanômetro
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PNCQ	Programa Nacional de Controle de Qualidade
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
Tr	Tempo de Retenção
UV	Ultravioleta
$\nu$	Estiramento ou deformação axial
$\delta$	Deformação angular

## 1 INTRODUÇÃO

Compostos azólicos têm sido extensivamente utilizados no controle de doenças fúngicas de várias plantas e micoses humanas devido a sua eficácia, amplo espectro e custo relativamente baixo (Ribas e Ribas et al., 2016). Tal fato é considerado um fator de risco, pois pode levar ao desenvolvimento e/ou a transmissão de resistência a microrganismos na medicina humana, principalmente às espécies do gênero *Candida* (Müller et al., 2007). Estes microrganismos leveduriformes são de extrema importância clínica devido à alta frequência de colonização e infecção em seres humanos, estando também fortemente relacionadas às altas taxas de morbidade e mortalidade de pacientes imunocomprometidos (Deorukhkar e Saini, 2016).

Atualmente cerca de 150 espécies de *Candida* já foram descritas e cerca de quinze já foram reportadas por causar infecções locais ou sistêmicas no homem (Uppuluri et al., 2017), onde mais de 90% destas infecções são atribuídas, basicamente, a apenas cinco espécies: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, leveduras patogênicas cada vez mais implicadas em processos infecciosos humanos (Machado et al., 2016). Mundialmente, *C. albicans* é a espécie mais comumente isolada nas infecções superficiais ou invasivas, seguida por *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, sendo crescentes as infecções ocasionadas por espécies não-*albicans* (Colombo et al., 2006; Miceli et al., 2011).

De modo geral, o tratamento destas infecções é limitado devido à toxicidade dos fármacos atualmente utilizados, além da baixa eficiência de alguns e o desenvolvimento de resistência intrínseca ou adquirida de algumas destas espécies, devido, principalmente, ao uso indiscriminado e inadequado desses agentes antifúngicos (Patterson, 2005; Espinel-Ingroff, 2008). Este fato impõe um desafio à indústria farmacêutica no que diz respeito a pesquisas por compostos alternativos, mais seguros e eficientes, com comprovada atividade antifúngica e baixa toxicidade (Dhanasekaran et al., 2008; Marin, 2014).

Neste sentido, as plantas representam importante fonte para obtenção de compostos com potencial antifúngico, uma vez que muitos dos compostos extraídos de plantas, principalmente seus metabólitos secundários, têm sido descritos como inibidores de germinação de esporos de fungos fitopatogênicos e também têm

demonstrado potencial capacidade de inibição do crescimento de fungos patogênicos para o homem (Grayer e Harborne, 1994; Harborne e Williams, 2000). Partindo desta necessidade e reconhecendo que as plantas são uma fonte de compostos com atividade antimicrobiana, observa-se a existência de estudos bem-sucedidos com extratos, frações e moléculas isoladas de plantas, sendo estas já utilizadas etnofarmacologicamente contra candidíases ou cuja composição química seja um indício desta atividade (Moraes et al., 2015; Correia et al., 2016; Machado et al., 2016; Salari et al., 2016).

*Tripodanthus acutifolius* (Ruiz & Pavón) Van Tieghem é uma planta hemiparasita pertencente à família Loranthaceae e de ampla distribuição na América do Sul, sendo frequentemente estudada com base em seus usos na medicina popular, onde alguns trabalhos científicos já foram publicados relatando atividades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias, analgésicas, antipiréticas e diuréticas (Intersimone et al., 2005; Daud et al., 2005; 2006; Soberón et al., 2007; Soberón et al., 2010a; Soberón et al., 2010b; Soberón et al., 2010c; Silva, 2014; Souza et al., 2014). Com relação à atividade antimicrobiana já foram descritas atividades contra cepas Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (MRSA) (Souza et al., 2014) e cepas Gram-negativas, como *Pseudomonas aeruginosa* (Soberón et al., 2010c), entre outros, podendo esta atividade estar relacionada com os principais constituintes químicos identificados para esta planta, que incluem, principalmente, compostos polifenólicos, como flavonoides (rutina, nicotiflorina, hiperósido e isoquercetrina), taninos condensados e catequinas (catequina, epicatequina e catequina-4- $\beta$ -ol), além de um raro composto isolado e identificado como tripodantosídeo (Soberón et al., 2010c; Silva, 2014; Coelho et al., 2018).

Tal fato estimula a busca por novas propriedades dos extratos e frações obtidos a partir de *T. acutifolius*, principalmente frente às cepas de *Candida*, uma vez que nas principais bases de dados de pesquisa da literatura científica (Google Scholar, Periódicos da Capes, Science Direct, Scielo e PubMed) ainda não foram encontrados relatos relacionando *T. acutifolius* com propriedades anti-*Candida*.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* e as propriedades toxicológicas do extrato vegetal bruto obtido a partir das folhas de *Tripodanthus acutifolius*, sobre isolados do gênero *Candida*.

### **2.2 Objetivos específicos**

2.2.1 Obter o extrato metanólico bruto (EMB) a partir das folhas de *T. acutifolius*;

2.2.2 Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do EMB de *T. acutifolius* frente às espécies de *Candida* spp.;

2.2.3 Determinar o tipo de interação entre o EMB e o agente antifúngico sintético (fluconazol);

2.2.4 Avaliar a toxicidade do EMB, através de ensaios de viabilidade celular, grau de irritação de mucosas e avaliação histopatológica de dano tecidual;

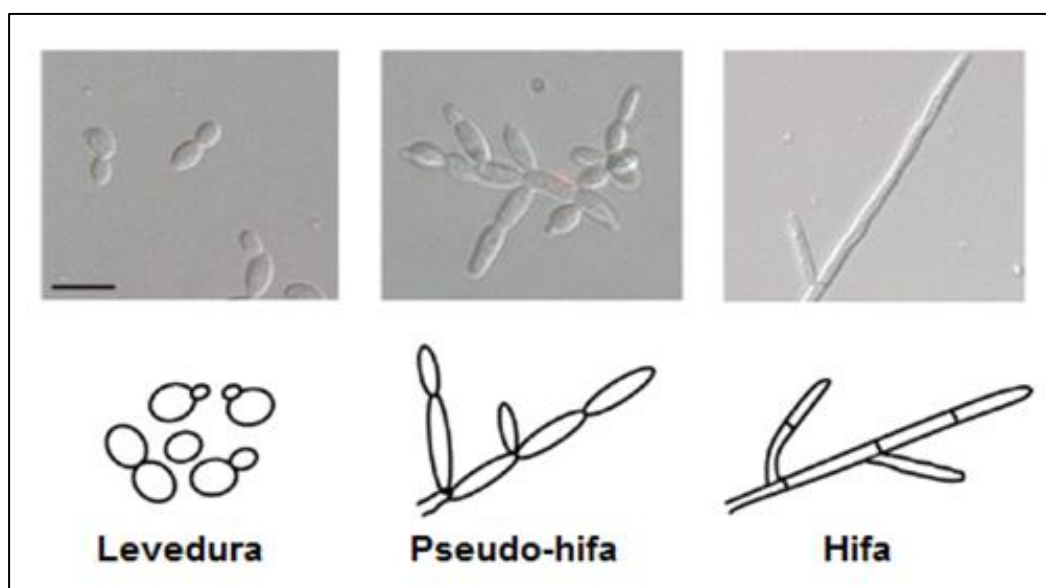
2.2.5 Avaliar o perfil fitoquímico do EMB.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Aspectos gerais do gênero *Candida*

O gênero *Candida*, pertencente à família Saccharomycetaceae da ordem Saccharomycetales, compreende cerca de 150 espécies conhecidas, podendo ser encontradas no solo, água, vegetais, animais, alimentos, no homem e em ambientes hospitalares (Diezmann et al., 2004; Cooper Jr, 2011; Uppuluri et al., 2017).

São organismos eucarióticos, de fina parede celular e reprodução assexuada por brotamento (Cooper Jr, 2011). Podem apresentar três tipos de morfologia celular: levedura (célula individual ovoide), pseudo-hifa (células em forma de elipse, com constrições no local dos septos e sem poro de comunicação entre as células) e hifa (células de largura uniforme, com septos verdadeiros e poros localizados na região do septo para comunicação entre as células) (Figura 1).



**Figura 1.** Diferentes morfologias que podem ser apresentadas por algumas espécies do gênero *Candida*. Imagens de *C. albicans* obtidas por microscopia de contraste por interferência diferencial (barra = 10 $\mu$ m). Fonte: Thompson et al., 2011.

Estes três tipos de morfologia possibilitam distintos habitats e potencial de virulência, onde a forma de levedura facilita a disseminação e a forma de hifa confere uma característica mais invasiva e conseqüentemente mais patogênica às espécies (Thompson et al., 2011).

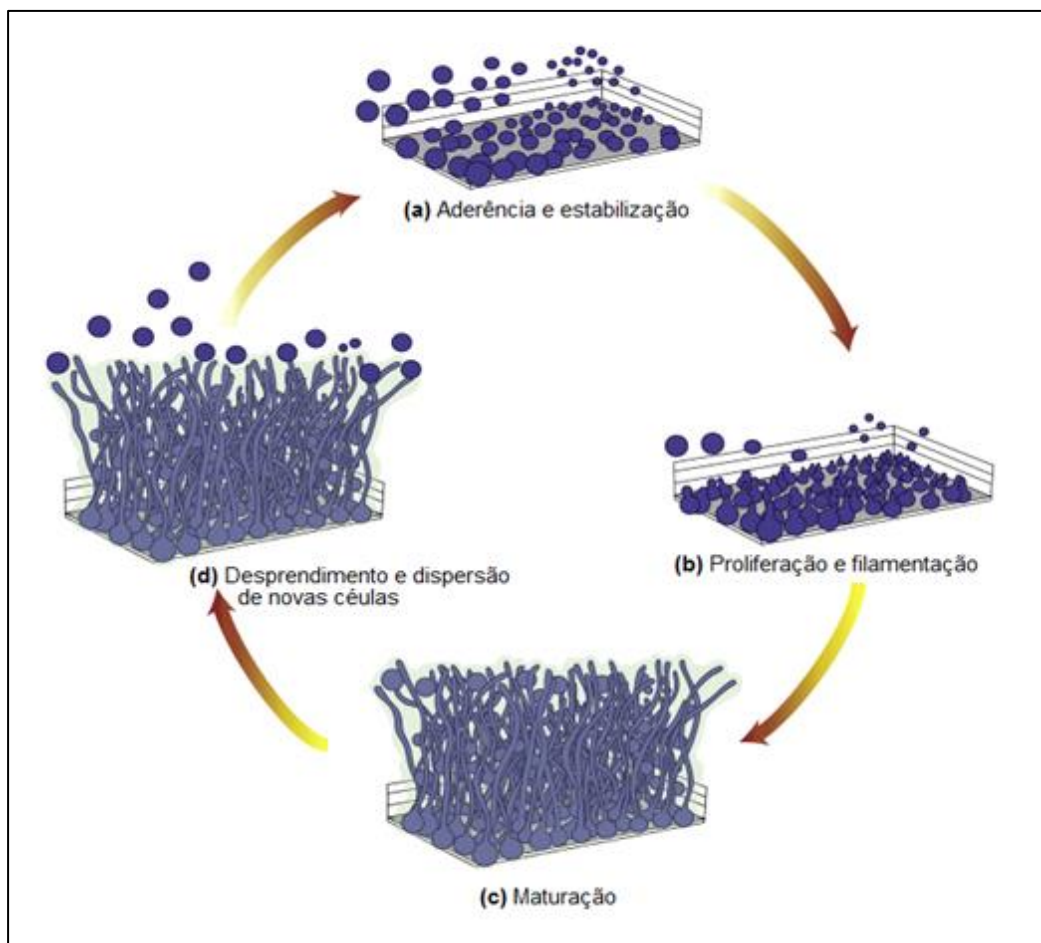
Outro mecanismo de virulência apresentado por algumas espécies de *Candida* spp. é a habilidade de formação de biofilme, estabelecendo-se tanto em superfícies



bióticas (como em plantas e em tecidos de animais), quanto em superfícies abióticas (como em catéteres, próteses e biomateriais) (Sardi et al., 2013; Gulati e Nobile, 2016). Este biofilme consiste de um amontoado de células microbianas aderidas a uma superfície, estando estas incorporadas em uma matriz extracelular constituída de polissacarídeos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. A formação de biofilme por espécies de *Candida* spp. segue, resumidamente, o seguinte fluxo: células leveduriformes livres aderem-se a uma superfície e estabilizam-se, iniciando a proliferação e filamentação de algumas células. Segue-se então a maturação do biofilme, resultando em uma rede complexa de várias camadas de células polimórficas (incluindo células em hifas, células em pseudo-hifas e células em forma de levedura), todas envoltas em uma matriz extracelular, dando ao biofilme uma aparência espessa e estruturada, fornecendo proteção contra lesões físicas e químicas. Finalizando o desenvolvimento do biofilme, ocorre o desprendimento e dispersão de algumas células leveduriformes, que aderem-se em novas superfícies, reiniciando o ciclo (Gulati e Nobile, 2016) (Figura 2).

Muitas destas espécies relacionam-se comensalmente com o homem, como habitantes normais do trato gastrointestinal, tecido muco cutâneos e pele (Cooper Jr, 2011). Entretanto, sendo estes microrganismos oportunistas, distúrbios no equilíbrio resultantes, por exemplo, de variações no ambiente local (mudanças de pH ou mudanças nutricionais) e o uso de antibióticos ou alterações no sistema imunológico (causadas por uma infecção ou terapia imunossupressora), podem permitir sua rápida proliferação, ocasionando problemas de saúde (Cooper Jr, 2011; Gulati e Nobile, 2016; Uppuluri et al., 2017)

Das 150 espécies conhecidas, apenas quinze são reportadas por causar infecções locais ou sistêmicas no homem, uma vez que cerca de 65% das espécies de *Candida* spp. não conseguem crescer a uma temperatura de 37 °C, sendo elas: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. pelliculosa*, *C. kefyr*, *C. lipolytica*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. rugosa* e *C. norvegensis* (Cooper Jr, 2011; Uppuluri et al., 2017). Entretanto, 95–97% das infecções fúngicas invasivas são atribuídas, basicamente, a apenas cinco espécies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (Giolo e Svidzinski, 2010; Machado et al., 2016.)



**Figura 2.** Ciclo de formação de biofilme em *C. albicans*: (a) Aderência e estabilização de células leveduriformes em uma superfície; (b) Proliferação, para a formação de uma camada basal de aderência, e filamentação de algumas células; (c) Maturação, onde há o desenvolvimento das células e o desenvolvimento da matriz extracelular; e (d) Desprendimento e dispersão, onde células leveduriformes desprendem-se e aderem-se a novas superfícies. Fonte: Gulati e Nobile, 2016.

### 3.1.1 *Candida albicans*

Esta espécie pode apresentar relação comensal com seu hospedeiro por um longo período, habitando pele, orofaringe, trato respiratório inferior, trato gastrointestinal e sistema geniturinário de pessoas saudáveis (Dühring et al., 2015). Entretanto é o seu potencial patogênico que a torna mais conhecida, estando predominantemente envolvida em infecções fúngicas invasivas, representando assim um sério problema de saúde devido às altas taxas de morbidade e mortalidade, além de importância econômica devido ao aumento dos custos de cuidados e duração das internações hospitalares (Cooper Jr, 2011; Sardi et al., 2013). Seu elevado potencial patogênico pode ser atribuído, entre outras características, às suas variadas formas morfológicas, que transitam da forma leveduriforme à forma de pseudo-hifas e hifa

verdadeira (dimorfismo), além da formação de clamidósporos, tornando-as mais resistentes (Staib e Morschhäuser, 2006; Cooper Jr, 2011; Thompson et al., 2011). Clamidósporos são células grandes, esféricas e de paredes grossas, que são normalmente produzidas nas extremidades das hifas em resposta a condições precárias de nutrientes (Staib e Morschhäuser, 2006; Thompson et al., 2011).

Além destas características, *C. albicans* mostra grande habilidade na formação de biofilme, implicando em sua elevada virulência e patogenicidade, onde evidências sugerem que a maioria das infecções causadas por esta espécie estão associadas com a formação de biofilme (Ramage et al., 2005; Gulati e Nobile, 2016).

### **3.1.2 *Candida glabrata***

Diferentemente de *C. albicans*, esta espécie não é polimórfica, crescendo apenas em forma de levedura, embora alguns estudos também tenham atribuído característica de pseudo-hifa (Thompson et al., 2011; Silva et al., 2012).

Originalmente foi classificada no gênero *Torulopsis*, devido a não formação de pseudo-hifa. No entanto, esta característica não foi considerada um fator distintivo confiável para os membros do gênero *Candida* spp. e propôs-se, após observações moleculares e fenotípicas, que *Torulopsis glabrata* pudesse ser classificado no gênero *Candida*. Além disso, sua forte associação com infecções humanas, assim como demais espécies do gênero, foi fator decisivo para sua reclassificação (Cooper Jr, 2011; Silva et al., 2012; Rodrigues et al., 2014).

São microrganismos constituintes da flora normal de indivíduos saudáveis, podendo colonizar a superfície da boca, esôfago, intestino e mucosa da vagina (Rodrigues et al., 2014). No entanto, sugere-se que o uso generalizado de terapias imunossupressoras, juntamente com o tratamento com antibióticos de amplo espectro, fez aumentar a frequência de infecções locais e sistêmicas causadas por *C. glabrata* (Silva et al., 2012).

Relatos apontam *C. glabrata* colonizando tecidos de hospedeiros, bem como as superfícies abióticas, através da formação de biofilme, onde esta habilidade confere vantagem ecológica, ajudando na sobrevivência como comensais e agentes patogênicos dos seres humanos, bem como resistindo ao tratamento antifúngico e a pressão competitiva de outros microrganismos (Silva et al., 2012; Thompson et al., 2011; Rodrigues et al., 2014).

### **3.1.3 *Candida krusei***

Em contraste com a maioria das outras espécies do gênero, esta espécie apresenta forma mais alongada, com aparência de "longos grãos de arroz" e geralmente é encontrada em duas formas morfológicas, como leveduras e pseudo-hifas, sendo isolada de uma grande variedade de habitats naturais, incluindo a atmosfera, frutas, alimentos (como carnes e derivados lácteos) esgoto, solo, vinho e cerveja (Samaranayake e Samaranayake, 1994; Reichart et al., 2002).

Pode ser considerado um microrganismo comensal do homem, não sendo muito frequente o seu isolamento a partir de mucosa de indivíduos sadios (Samaranayake e Samaranayake, 1994). Embora represente uma menor porcentagem dos isolados em infecções invasivas, *C. krusei* representa importante agente patogênico para pacientes imunocomprometidos, uma vez que apresenta resistência intrínseca a alguns agentes antifúngicos (Fleischmann et al., 2017).

### **3.1.4 *Candida parapsilosis***

Esta espécie não produz hifas verdadeiras, mas pode gerar pseudo-hifas que são caracteristicamente grandes e curvas, sendo muitas vezes chamadas como "células gigantes" (Silva et al., 2012). Em comparação com as demais espécies do gênero, *C. parapsilosis* apresenta ampla distribuição na natureza, sendo isolada de animais domésticos, insetos, solo, plantas e ambientes marinhos (Trofa et al., 2008; van Asbeck et al., 2009).

Os primeiros relatos descreviam esta espécie como organismo relativamente não patogênico, componente das superfícies mucosas, pele e unhas de indivíduos saudáveis (van Asbeck et al., 2009). Entretanto, tratando-se de um microrganismo oportunista, alguns fatores acabaram levando a um aumento de sua incidência e conseqüentemente a um aumento das infecções, taxas de morbidade e mortalidade, principalmente de pacientes imunocomprometidos (Trofa et al., 2008; van Asbeck et al., 2009; Silva et al., 2012; Deorukhkar e Saini, 2016). Um importante fator de virulência desta espécie é a formação de biofilme, apresentando alta afinidade por superfícies protéticas, catéteres venosos e equipamentos de nutrição parenteral, tornando *C. parapsilosis* umas das causas mais comuns de infecção em pacientes hospitalizados (Trofa et al., 2008; Cooper Jr, 2011).

### **3.1.5 *Candida tropicalis***

Morfologicamente *C. tropicalis* pode apresentar a forma de levedura, pseudo-hifa e até mesmo hifa verdadeiras (Silva et al., 2012). É considerada uma espécie cosmopolita, podendo ser isolada de diferentes substratos como cascas, raízes, folhas, lama, água e ambientes marinhos, sendo este último substrato fonte de cepas com potencial aplicação na agricultura, fermentação industrial e na indústria química (Yan et al., 2010).

Embora apresente benefícios no ramo da biotecnologia, *C. tropicalis* ganha destaque devido a sua alta associação com infecções fúngicas invasivas, sendo considerada a primeira ou segunda espécie de *Candida* não-*albicans* mais frequentemente isolada da corrente sanguínea e do trato urinário (Trofa et al., 2008; Silva et al., 2012). Este fato pode estar relacionado a alguns fatores de virulência apresentados por esta espécie, como formação de biofilme, secreção de proteinases e dimorfismo (Silva et al., 2012).

### **3.2 Epidemiologia das espécies**

Fungos e outras espécies microbianas podem ser amplamente encontrados no meio ambiente e também vivendo em relação comensal com o homem (Martins et al., 2015). Entretanto, nas últimas duas décadas têm-se observado um aumento considerável na incidência de infecções fúngicas não somente em hospitais, o que já compromete ainda mais a saúde de pacientes imunocomprometidos, mas também no resto da população (Martins et al., 2015.)

De modo geral, as leveduras do gênero *Candida* têm grande importância pela alta frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano, tornando-se altamente patogênicas, caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou comprometimento de barreiras anatômicas, podendo levar a infecções superficiais ou invasivas, como infecções mucocutâneas e infecções mais agressivas como endocardite, meningite e peritonite (Colombo e Guimarães, 2003; Martins et al., 2015).

Entre as infecções invasivas causadas por espécies do gênero *Candida*, destaca-se os casos de infecção de corrente sanguínea, complicação conhecida como candidemia, sendo umas das principais causas de morbidade e mortalidade de pacientes hospitalizados (Colombo e Guimarães, 2003; Deorukhkar e Saini, 2016).

Essas infecções de corrente sanguínea são consideradas a quarta causa de infecção nos Estados Unidos da América (EUA) e classificadas entre a quarta e a sétima causa na Europa (Sifuentes-Osornio et al., 2012). No Brasil, 6% de todas as infecções sanguíneas nosocomiais são ocasionadas por espécies do gênero *Candida* (Marra et al., 2011).

Historicamente, *Candida albicans* tem sido o isolado mais comum em candidemias, no entanto, há um aumento na incidência de espécies não-*albicans* (da Costa et al., 2014), onde o cenário de distribuição das espécies varia de acordo com área e sistema de saúde (Deorukhkar e Saini, 2016). Nos EUA, por exemplo, *C. glabrata* é a segunda espécie mais comumente isolada de infecções invasivas, sendo menos frequentemente isolada em outros países (Miceli et al., 2011). Já no Brasil, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* representam a segunda, terceira, quinta e sexta espécies mais comumente isoladas de infecções sanguíneas nosocomiais, respectivamente (Marra et al., 2011). Na Austrália, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* correspondem a segunda e a terceira colocação, respectivamente (Chen et al., 2006).

Antes considerada como um saprófito de baixa virulência, *C. glabrata* emergiu como um importante patógeno de ambiente hospitalar, sendo associada às altas taxas de morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos e hospitalizados, uma vez que os longos períodos de internação e a ampla utilização de antibióticos nestes ambientes tornam-se fatores de risco para colonização desta espécie (Fidel Jr et al., 1999; Deorukhkar e Saini, 2016). Atualmente, *C. glabrata* vem sendo responsável pelas infecções de mucosa e associada à cerca de 15% das infecções de corrente sanguínea ocasionadas pelo gênero (Rodrigues et al., 2014).

*C. tropicalis* é geralmente isolada de pacientes neutropênicos e outros pacientes imunocomprometidos, muito provavelmente devido ao uso extensivo de antibióticos com finalidade profilática (Sifuentes-Osornio et al., 2012). Alguns estudos apontam *C. tropicalis* responsável por uma maior taxa de mortalidade do que outras espécies não-*albicans*, e até mesmo *C. albicans*, devido ao seu alto potencial de virulência (Silva et al., 2011).

Inicialmente considerada como um microrganismo não patogênico, *C. parapsilosis* aumentou dramaticamente sua significância e prevalência nas últimas duas décadas, tornando-se uma das principais causas de infecções fúngicas

invasivas, uma vez que facilmente coloniza catéteres e próteses devido a sua capacidade de formação de biofilme (Trofa et al., 2008). É comumente isolada de unidades neonatais de terapia intensiva, estando muitas vezes associada às taxas de mortalidades destes neonatos (Deorukhkar e Saini, 2016).

Nos últimos anos, *C. krusei* surgiu como importante patógeno causador de um amplo espectro de manifestações clínicas em pacientes hospitalizados (Samranayake e Samaranayake, 1994). O advento do HIV/AIDS levou a um uso generalizado de azóis, especialmente fluconazol, na prevenção e tratamento de infecções fúngicas desses pacientes, contribuindo para o aumento da incidência de infecções por *C. krusei* (Deorukhkar e Saini, 2016).

Além de importantes patógenos humanos, espécies deste gênero também vêm sendo encontradas no leite de vacas diagnosticadas com mastite fúngica (Crawshaw et al., 2005). Dworecka-Kaszak e colaboradores (2012) avaliaram 66 amostras de leite coletadas de 44 vacas com mastite clínica, identificando a presença de *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* e *C. albicans*. Outro estudo avaliou a presença de espécies do gênero *Candida* em amostras de queijo artesanal produzido a partir de leite de vaca *in natura*, encontrando *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr* e *C. lusitaniae* (Wanderley et al., 2013)

A presença destes patógenos nestes animais, e conseqüentemente nos produtos derivados destes, pode implicar na circulação de cepas resistentes fora do ambiente hospitalar, além da ocorrência de infecções fúngicas através dos alimentos (Maroszyńska et al., 2013).

### **3.3 Resistência microbiana**

Os medicamentos antimicrobianos são compostos que são ativos contra uma série de infecções, como as causadas por bactérias (antibióticos), vírus (antivirais), fungos (antifúngicos) e parasitas (incluindo antimaláricos). Foi a descoberta da penicilina, em 1928, por Alexander Fleming, que marcou o início da era dourada dos antibióticos, que seguiu e ganhou grande destaque nas décadas de 1960 e 1970 devido à derrota da varíola e da poliomielite (O'Neill, 2016; Venter et al., 2017). Entretanto, cerca de 50 anos depois, a Organização Mundial da Saúde alerta que o uso indiscriminado e excessivo destes antibióticos pode tornar fatais pequenas infecções, devido à resistência adquirida pelos microrganismos (OMS, 2014).

A resistência microbiana surge quando o microrganismo que causa infecção sobrevive à exposição de um determinado medicamento que normalmente o mataria ou desaceleraria seu crescimento, permitindo que este cresça e se dissemine mais facilmente devido à falta de concorrência, transmitindo assim a característica de resistência (O'Neill, 2016). Esta característica é um processo natural observado desde que os primeiros antibióticos foram descobertos. No entanto torna-se cada vez mais um problema, uma vez que o uso excessivo de antibióticos acelera este processo, tornando o arsenal antimicrobiano existente atualmente quase ineficiente ou esgotado (O'Neill, 2014).

Além de muito utilizados na clínica médica, antimicrobianos também são extensivamente utilizados no campo, estimando que sua utilização na agricultura, em uma escala global, varie de cerca de 63 mil toneladas a mais de 240 mil toneladas por ano (O'Neill, 2014; 2015). No campo, embora sejam utilizados terapeuticamente em animais para tratar doenças clínicas, também são aplicados de forma profilática para prevenir surtos de doenças comuns e sub-terapeuticamente para o crescimento animal (Venter et al., 2017).

De modo geral, esse uso excessivo e indiscriminado dos antibióticos nas diferentes áreas aumenta a pressão seletiva, favorecendo assim o surgimento, multiplicação e disseminação de cepas resistente (Knöppel et al., 2017). Além disso, sua ampla utilização pode tornar a presença destes medicamentos no meio ambiente um processo cíclico, uma vez que através de resíduos humanos, animais e industriais, contaminam o solo, culturas e fontes de água, também incentivando o desenvolvimento da resistência entre os patógenos com os quais estes meios interagem (OMS, 2014; O'Neill, 2015; Venter et al., 2017).

Atualmente, existem cinco classes principais de agentes antifúngicos amplamente utilizados contra os principais patógenos fúngicos, incluindo espécies de *Candida*, sendo eles: polienos, azóis, alilaminas/tiocarbamatos, fluoropirimidina e equinocandinas (Maurya et al., 2013). Destes, o grupo dos azóis é muito utilizado na agricultura e na viticultura para o controle do crescimento de fungos em plantas e frutas, além de serem considerados antifúngicos de primeira linha para o tratamento de micoses submucosas e invasivas humanas (Müller et al., 2007). Estes incluem os derivados imidazólicos (miconazol e cetoconazol), os triazóis de 1ª geração (itraconazol e fluconazol) e os de 2ª geração (voriconazol, posaconazol e



ravuconazol). Devido à eficiência e baixo custo, o fluconazol é o antifúngico mais utilizado (Pfaller e Diekema, 2010; Kathiravan et al., 2012). Este composto atua de forma a inibir a biossíntese do ergosterol através do bloqueio da ação da enzima lanosterol-14- $\alpha$ -desmetilase, codificada pelo gene ERG11, que converte por desmetilação o lanosterol em ergosterol. Como consequência da inibição desta enzima, há acúmulo de precursores metilados tóxicos gerados no processo de biossíntese do ergosterol, levando à inibição do crescimento celular e conferindo assim uma ação fungistática aos azóis, principalmente frente à *Candida* spp. (Alencar, 2015).

No meio ambiente, fungicidas azólicos são amplamente utilizados na agricultura e na horticultura para reduzir a degradação ocasionada pelos fungos em plantas. A Holanda, por exemplo, usa uma grande quantidade de fungicidas na produção de tulipas, mergulhando o bulbo da flor em fungicida antes desta ser plantada. Não surpreendentemente, este país possui uma das mais altas taxas de resistência antifúngica aos azóis em cepas de *Aspergillus fumigatus* (O'Neill, 2015). Outro estudo demonstra o perfil de resistência apresentado por espécies do gênero *Candida* quando utilizados compostos azólicos na agricultura, onde o fluconazol apresentou concentração inibitória mínima superior sobre os isolados obtidos de frutas de fazenda não-orgânicas, em comparação com aqueles obtidos de frutas de fazendas orgânicas (Arendrup, 2013).

Müller e colaboradores (2007) destacam que o uso de grandes quantidades de fungicidas azólicos na proteção de plantas é um fator de risco para o desenvolvimento e/ou transmissão de resistência a demais microrganismos de importância na medicina humana. Este fato merece devida atenção, uma vez que, em comparação com o arsenal antifúngico utilizado no controle de doenças em plantas, o campo da medicina apresenta limitações, principalmente devido a problemas relacionados com a eficácia e toxicidade da droga (Ribas e Ribas et al., 2016). Na área da medicina, os derivados azólicos são a maior classe de drogas antifúngicas de uso clínico e primeira escolha no tratamento de infecções fúngicas, especialmente as causadas por *Candida* spp. (Müller et al., 2007).

Como citado anteriormente, a ampla utilização destes antifúngicos, tanto na agricultura quanto na medicina, resulta na seleção ou na emergência de cepas resistentes, onde os principais mecanismos de resistência aos azóis incluem (i)

mudanças na parede celular ou membrana plasmática, que levam à diminuição da absorção do antifúngico; (ii) alterações no gene ERG11, que codifica a enzima alvo, interferindo na afinidade da droga com seu alvo; e, (iii) o efluxo de drogas mediado por proteínas de transporte de membrana, codificadas pelos genes CDR1 e CDR2 ou efluxo da droga mediado por proteínas facilitadoras, codificadas pelos genes MDR1 e FLU1 (Sanguinetti et al., 2005).

O desenvolvimento destes mecanismos de resistência pelos microrganismos é rápido, tornando fundamental e contínua a busca por novos agentes antifúngicos (Treméa, 2015). Neste sentido as plantas representam importante fonte para obtenção de compostos biologicamente ativos, sendo frequentemente alvos de investigação científica, seja pelas inúmeras espécies vegetais ainda não estudadas, seja pelo comprovado espectro da atividade inibitória sobre alguns microrganismos que algumas espécies vegetais possuem, propriedades estas apoiadas na medicina popular (Souza et al., 2014; Silva, 2014)

### **3.4 Plantas medicinais**

Durante muitos séculos as plantas constituíram principal fonte de agentes terapêuticos, correspondendo à única fonte de tratamento e cura de doenças de muitos grupos culturais (Rishton, 2008; Giordani et al., 2015). Atualmente, mesmo com os avanços na medicina, as plantas ainda constituem fonte para obtenção de compostos biologicamente ativos (Treméa, 2015; Silva, 2014).

Reconhecendo que as plantas são uma fonte de compostos com atividade antimicrobiana, observa-se a existência de estudos bem-sucedidos com extratos, frações e moléculas isoladas de plantas, sendo estas já utilizadas etnofarmacologicamente contra infecções ocasionadas por espécies do gênero *Candida*, ou cuja composição química seja um indício desta atividade, como por exemplo, Moraes e colaboradores (2015) encontraram significativa atividade antifúngica sobre espécies não-*albicans*, em composto isolado de *Uncaria tomentosa* (unha-de-gato). Outro estudo, realizado por Salari e colaboradores (2016), demonstrou atividade antifúngica do extrato de *Salvia rhytidea* sobre as espécies *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. albicans*. Outras espécies vegetais que demonstram atividade antifúngica contra espécies de *Candida* spp. foram *Eugenia dysenterica* e *Pouteria ramiflora*, onde em seus extratos foram identificados compostos polifenólicos

(flavonoides e catequinas), substâncias químicas com importante atividade antifúngica (Correia et al., 2016).

### **3.5 O gênero *Tripodanthus***

O gênero *Tripodanthus* pertence à família Loranthaceae, sendo essa a maior família da ordem Santalales, formada por 76 gêneros e 1042 espécies hemiparasitas, ou seja, espécies parasitas que realizam fotossíntese pelo menos durante um estágio do ciclo de vida, mas que obtém água e nutrientes do xilema da planta hospedeira (Nickrent et al., 2010; 2017). Esse mecanismo para obtenção de água e nutrientes se dá através da formação de estruturas especializadas, os haustórios, que conectam o sistema vascular do parasita ao hospedeiro (Kuijt, 1969).

A presença de clorofila e a realização de fotossíntese faz com que a planta metabolize seus próprios compostos orgânicos, e essa característica aliada ao hemiparasitismo contribui para a grande capacidade de proliferação das espécies deste gênero (Rotta et al., 2005), que podem ser encontradas parasitando as raízes e principalmente os caules de diversos grupos, como arbustos, plantas lenhosas de floresta, árvores frutíferas, ornamentais, de ambiente urbano, entre outros (Nickert et al., 2010; Silva, 2014).

Popularmente as plantas desta família são conhecidas como erva-de-passarinho, pois grande parte de suas espécies dependem dos pássaros para dispersão e germinação de suas sementes, uma vez que estes, após consumirem seus frutos, regurgitam e/ou defecam, liberando estas sementes, que aderem-se as plantas hospedeiras por possuírem uma camada de substância mucilaginosa (Leal et al., 2006; Dettke e Waechter, 2014).

*Tripodanthus* é composto por apenas três espécies, apresentando ocorrência predominantemente na América do Sul: *Tripodanthus belmirensis* Roldan & Kuijt, endêmica da Colômbia; *Tripodanthus flagellaris* (Cham. & Schldl.) Tiegh, Uruguai e Argentina; e, *Tripodanthus acutifolius* (Ruiz & Pav.) Tiegh, espécie com distribuição mais ampla, ocorrendo desde a Venezuela até a região central da Argentina, de onde se estende para o Uruguai, Sul do Brasil e para o norte até a Bahia (Dettke e Waechter, 2014; Nickrent, 2017).

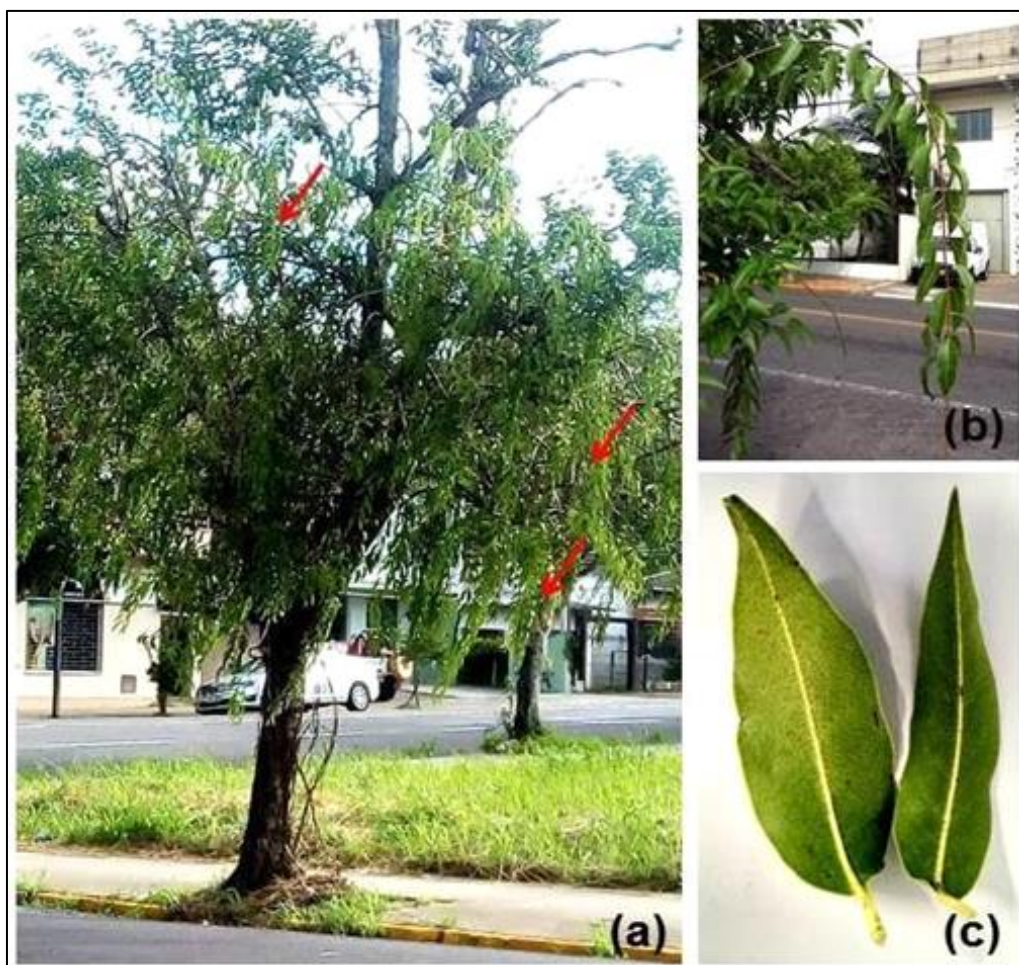
### 3.5.1 *Tripodanthus acutifolius* (Ruiz & Pav.) Tiegh

No Brasil, *Tripodanthus acutifolius*, cujas sinonímias são *T. eugenioides* (Kunth) Tiegh., *Phrygilanthus acutifolius* (Ruiz & Pav.) Eichler, *P. eugenioides* (Kunth) Eichler e *Loranthus acutifolius* Ruiz & Pav., é a única espécie do gênero, apresentando distribuição pelos biomas do Cerrado, Floresta Atlântica e Pampa, com ampla ocorrência nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Dettke e Waechter, 2014).

Apresenta característica de erva, eventualmente arbusto ou árvore, podendo ser encontrada parasitando caule e raízes, onde, após seu estabelecimento, suas raízes epicorticais crescem e juntam-se às raízes do hospedeiro, criando conexões com as raízes do próprio hospedeiro ou até mesmo com raízes de indivíduos próximos (Nickrent et al., 2010; Brandão, 2015). Pode ser facilmente reconhecida por suas folhas coriáceas de ápice agudo e com lenticelas em sua face abaxial, ramos pendentes, longas inflorescências laterais e terminais, flores com pétalas alvas e bastante perfumadas (Dettke e Waechter, 2014) (Figura 3).

De modo geral, esta planta pode ser encontrada parasitando grupos como Anacardiáceas, Leguminosas, Oleaceas, Sapindáceas e Zigofiláceas (Wagner et al., 2009; Silva, 2014). Em sua distribuição pelo bioma do Cerrado e Mata Atlântica (região sudeste), ocorre em espécies de árvores ornamentais dos gêneros *Cupressus*, *Casuarina* e *Ligustrum*, prejudicando o crescimento das mesmas e também acarretando na perda de produção em várias árvores frutíferas, especialmente *Citrus* spp. e *Mangifera indica* (Leal et al., 2006).

Apesar da característica de hemiparasitismo comprometer o vigor das plantas hospedeiras, um estudo realizado na cidade de Curitiba, PR, apontou a presença *T. acutifolius* como um fator de contribuição ao cenário urbano, uma vez que considera bonita a característica visual desta espécie (Rotta et al., 2005). Além deste ponto positivo, a espécie também vem sendo apontada como fonte de recurso para medicina popular e com base nesta muitos estudos já foram realizados a fim de identificar as propriedades farmacológicas de *T. acutifolius* (Silva, 2014).



**Figura 3.** *Tripodanthus acutifolius* (Ruiz & Pav.) Tiegh. (a) *T. acutifolius* parasitando *Ligustrum lucidum* (Oleaceae); (b) Característica de ramos pendentes; e (c) Característica das folhas com ápice agudo e presença de lenticelas na face abaxial.  
Fonte: Autora

Intersimone e colaboradores (2005) avaliaram o potencial diurético do extrato aquoso e etanólico das flores de *T. acutifolius* em ratos, em comparação com a furosemida. Ambos os extratos levaram a uma diminuição da excreção de potássio pela urina, o que sugere uma ação diurética que atua como poupadora de potássio.

Os efeitos anti-inflamatório, analgésico e antitérmico do extrato aquoso e etanólico das flores de *T. acutifolius*, a partir de administração oral, foram testados em ratos. Em relação ao efeito anti-inflamatório, os resultados demonstraram que o extrato aquoso reduziu significativamente o edema induzido por carragenina. Em relação ao efeito analgésico, a administração do extrato aquoso causou uma inibição da resposta de contorcimento induzida pelo ácido acético, assim como também demonstrou diminuição significativa no estímulo doloroso induzido por formalina. E em relação ao efeito antitérmico, o extrato aquoso causou uma diminuição

significativa na temperatura retal de ratos hipotérmicos, condição esta induzida pela administração de fermento de cerveja aos ratos (Daud et al., 2006).

No Brasil, Silva e colaboradores (2014) avaliaram e confirmaram a atividade antioxidante *in vitro* do extrato aquoso das folhas de *T. acutifolius*. Esta avaliação revelou que este extrato possui capacidade de inibição de formação e/ou captura do radical livre DPPH em todas as concentrações testadas.

Outro estudo avaliou o efeito protetor do extrato hidroalcoólico de *T. acutifolius* em ratos com alta concentração de colesterol no sangue. O estudo demonstrou um desempenho efetivo deste extrato na regulação do metabolismo do colesterol, onde a suplementação com este extrato resultou em diminuições significativas no colesterol total, triglicerídeos e nos níveis de lipoproteínas de baixa densidade, enquanto níveis de lipoproteínas de alta densidade aumentaram significativamente em todos os grupos em relação aos controles (Coelho et al., 2018).

Silva e colaboradores (2014) avaliaram a atividade gastroprotetora do extrato aquoso das folhas de *T. acutifolius*, em ratos, após indução de lesões gástricas por etanol absoluto. Este estudo demonstrou que a administração oral do extrato aquoso de *T. acutifolius* reduziu a área das lesões, sugerindo possível ação gastroprotetora.

Em relação às propriedades antimicrobianas, vários estudos também apoiam o uso popular desta planta para esta finalidade. Como exemplo, pesquisas realizadas na região Sul do Brasil demonstraram propriedades antimicrobianas em cepas bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA), onde concentrações de 0,5 a 15 mg/mL foram capazes de inibir o crescimento de sete isolados de *S. aureus*, incluindo três isolados MRSA, estes inibidos a uma concentração de 2,5 e 15 mg/mL (Souza et al., 2014).

O extrato etanólico das flores de *T. acutifolius* inibiu o crescimento tanto de bactérias Gram-positivas, como *S. aureus*, *S. saprophyticus* e *Enterococcus faecalis*, quanto de bactérias Gram-negativas, como *Serratia marcescens*, *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas aeruginosa* (Daud et al., 2005).

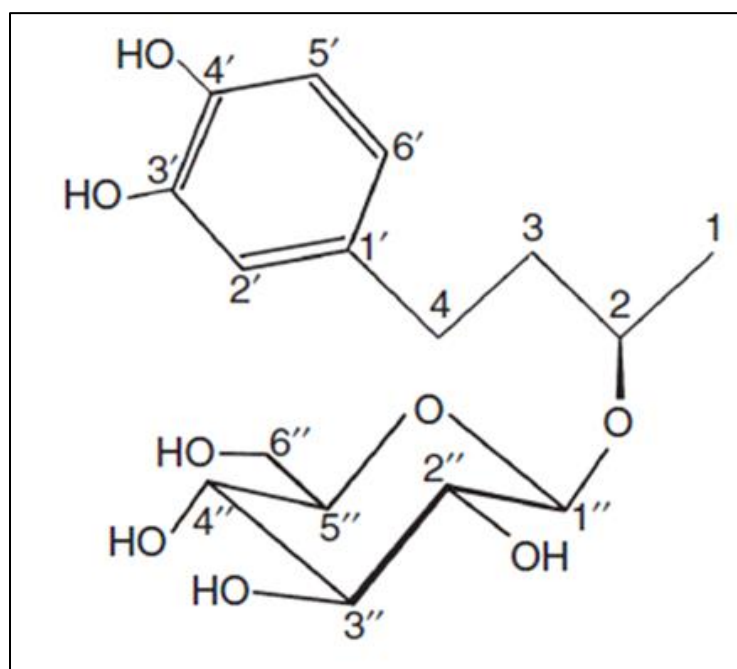
Soberón e colaboradores (2007) concluíram que o extrato aquoso de *T. acutifolius* apresenta uma menor concentração inibitória mínima para *Acinetobacter freundii* do que aquela apresentada por cefotaxima. Já a tintura de *T. acutifolius*, obtida por outro método extrativo, também apresenta menor concentração inibitória mínima para *Pseudomonas aeruginosa* do que aquela apresentada por cefotaxin ou

daquela apresentada pela oxacilina para *Staphylococcus aureus*.

Outro estudo realizado por Silva e colaboradores (2014) demonstrou a atividade amebicida do extrato aquoso de *T. acutifolius* contra trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii*, onde as concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 mg/mL inibiram em 96,89%, 87,8%, 62,08%, 42,34% e 28,58%, respectivamente, dos microrganismos.

Ainda, Muñoz e colaboradores (2000), em um estudo conduzido na Bolívia, relataram que o extrato das folhas de *T. acutifolius* apresenta propriedade antimalária.

Estas propriedades farmacológicas podem estar associadas aos metabólitos secundários de *T. acutifolius*, que incluem principalmente compostos polifenólicos, como flavonoides (rutina, quercetina, nicotiflorina, hiperósido e isoquercetrina), taninos condensados e catequinas (catequina, epicatequina e catequina-4- $\beta$ -ol), além de um raro composto isolado e identificado como tripodantosídeo (Figura 4) (Soberón et al., 2010c; Silva, 2014; Coelho et al., 2018).



**Figura 4.** Estrutura química do tripodantosídeo (4-(3',4'-dihidroxifenil)-2-R-butanol-2-O- $\beta$ -D-lucopiranosídeo). Fonte: Soberón et al., 2010c.

Genericamente, os compostos oriundos do metabolismo secundário das plantas são os mais relacionados com uma melhor capacidade de adaptação da própria planta para com o ambiente biótico e abiótico, assim como amplamente

estudados e reconhecidos por apresentarem propriedades relacionadas à expectativa de vida, ao bem-estar e até mesmo com a prevenção de algumas doenças/distúrbios (Martins et al., 2015; Gupta e Birdi, 2017).

De modo geral, flavonoides já apresentaram atividade antimicrobiana, onde alguns estudos demonstram que bactérias Gram-positivas são inibidas seletivamente por flavonoides e isoflavonoides derivado de plantas (Tereschuck et al., 1997). Flavonoides também vêm sendo citados como agentes no combate de infecções causadas por fungos no homem, isso devido à ampla capacidade destes compostos em inibir a germinação de esporos patogênicos (Grayer e Harborne, 1994; Harborne e Williams, 2000). Esta atividade antifúngica é provavelmente devida à capacidade destes compostos em formar complexos com proteínas extracelulares e solúveis, presentes nas paredes das células fúngicas, além de serem capazes de romper as membranas dos fungos, devido sua natureza lipofílica (Arif et al., 2009). Taninos, também extraídos de plantas, já demonstraram importante atividade bactericida e fungicida, uma vez que estimulam as células fagocíticas, essenciais no combate a infecções (Loquercio et al., 2005). Segundo Scarbert (1991), o mecanismo de ação antimicrobiana dos taninos pode ser explicado por três hipóteses: (i) taninos inibindo enzimas bacterianas e fúngicas e/ou se complexando com os substratos dessas enzimas; (ii) ação dos taninos sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando seu metabolismo; e, (iii) complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano. Outro estudo realizado por Hirasawa e Takada (2004) demonstrou que o uso de catequinas, isoladas a partir do chá-verde, e combinadas com demais antibióticos, como anfotericina B ou fluconazol, pode ser benéfico e pode contribuir para um tratamento eficaz de candidíases.

Compostos extraídos especificamente de *T. acutifolius* já apresentaram ação antibacteriana, onde esta ação seria parcialmente atribuída à rutina, nicotiflorina, hiperosídeo e a isoquercetina (glicoflavonoides) e principalmente ao tripodantosídeo, pelo fato deste ter sido identificado em maior concentração nas folhas (Soberón et al., 2007; 2010c). Além disso, atribuiu-se ao tripodantosídeo, a capacidade de diminuição das doses terapêuticas do fármaco Anfotericina B sobre duas espécies do gênero *Candida* (*C. albicans* e *C. tropicalis*) (Soberón et al., 2011).



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Local de realização da pesquisa

O preparo do extrato vegetal bruto, sua caracterização e ensaio de viabilidade celular sobre linhagem celular humana foram realizados nas dependências da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC). Os ensaios microbiológicos foram realizados nas dependências do Laboratório de Micologia Aplicada, na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os ensaios para avaliação do grau de irritação de mucosa e a avaliação histopatológica de dano tecidual foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Toxicologia, no Instituto Federal Catarinense. A Figura 5 mostra o delineamento experimental da pesquisa.

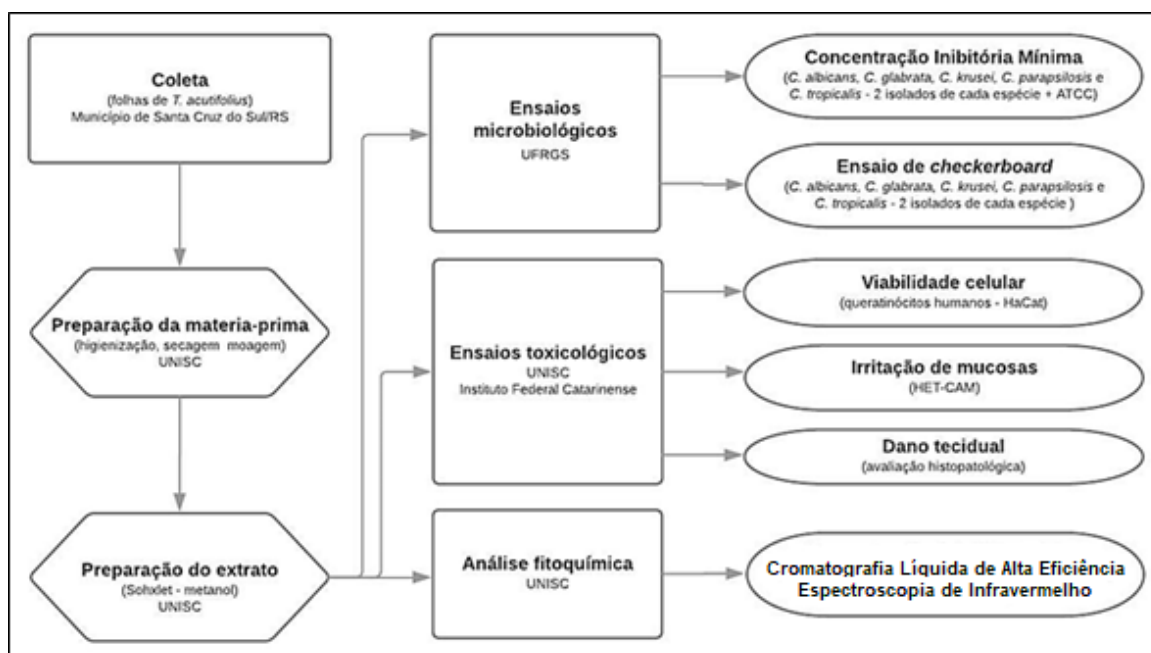


Figura 5. Fluxograma esquemático do delineamento da pesquisa.

### 4.2 Coleta, preparo do material vegetal e obtenção do extrato

As folhas de *Tripodanthus acutifolius* foram coletadas no município de Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, tendo como seu hospedeiro *Ligustrum lucidum* (Oleaceae) (Figura 6), conforme autorização de coleta (Anexo 1). A espécie identificada encontra-se depositada no Herbário do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande Sul (UFRGS), sob o número ICN 167796 (Anexo 2). O acesso ao patrimônio genético brasileiro foi informado ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), sob

o número AAFC1F0.



**Figura 6.** Exemplar selecionado para coleta, *Tripodanthus acutifolius* parasitando *Ligustrum lucidum*. Município de Santa Cruz do Sul/RS.

Para coleta foram consideradas apenas folhas íntegras, sem doenças, rasuras ou contaminantes. Estas folhas foram lavadas em água corrente e secas em uma estufa de ar circulante (Tecnal TE-394/5) a uma temperatura de 40 °C por um período de 48 horas. Em seguida foram moídas em moinho de facas tipo *Willie* (Tecnal TE-680) e armazenadas a temperatura ambiente em frascos fechados e protegidos da luz por um período de 48 horas. O extrato vegetal bruto foi obtido através da técnica de extração em *Soxhlet*, utilizando metanol como solvente. Para esta técnica, as folhas, já moídas, foram colocadas em um cartucho de celulose na câmara do extrator *Soxhlet*. O solvente foi colocado em um balão e aquecido através de uma manta aquecedora. Com o aquecimento, o vapor do solvente condensava-se na câmara do extrator, entrando em contato com as folhas moídas, realizando assim a extração dos compostos. Após, o líquido extrativo foi concentrado em evaporador rotativo (Tecnal

TE-210) e, em seguida, liofilizado (Liofilizador K120 Liobras), obtendo-se assim o extrato metanólico bruto (EMB) das folhas de *T. acutifolius*.

### 4.3 Ensaios microbiológicos

#### 4.3.1 Seleção dos microrganismos

Para realização do estudo foram selecionados onze isolados leveduriformes, incluindo um ATCC, distribuídos entre cinco espécies do gênero *Candida* spp., todos pertencentes à micoteca do Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada (GPMA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os isolados selecionados encontram-se apresentados na Tabela 1. Os isolados clínicos estão identificados fenotipicamente através do *Vitek Yeast Biochemical Card* (BioMerieux Vitek, Hazelwood, Mo.).

**Tabela 1.** Isolados leveduriformes selecionados para realização do estudo.

<b>Espécie</b>	<b>Código</b>	<b>Origem do isolado</b>
<i>Candida albicans</i>	ATCC18804	ATCC
	Ca01	PNCq
	Ca02	PNCq
<i>Candida glabrata</i>	CgRL12m	Indução de resistência
	Cg09	PNCq
<i>Candida krusei</i>	CkRL52	Fungemia
	CkRL102	Clínico
<i>Candida parapsilosis</i>	CpRL38	Urina (Clínico)
	CpRL13m	Indução de resistência
<i>Candida tropicalis</i>	Ct57A	Clínico
	Ct94P	Clínico

#### 4.3.2 Preparação dos inóculos

Primeiramente foram realizadas subculturas (repiques) dos microrganismos em Ágar Sabouraud Clorafenicol, assegurando a pureza e a viabilidade, incubando-os a 35 °C por 24 horas. O inóculo foi preparado a partir da cultura de 24 horas, onde as células foram suspensas em solução salina 0,85% estéril e a densidade celular ajustada com auxílio do espectrofotômetro em comprimento de onda de 530 nm, obtendo-se uma transmitância de 90%, que corresponde à solução-padrão 0,5 da escala de McFarland ( $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células/mL). A partir desta, preparou-se uma suspensão de trabalho fazendo uma diluição 1:50 seguida de uma diluição 1:20 em caldo RPMI 1640, resultando em um inóculo final correspondente a 0,5 a  $2,5 \times 10^3$  células/mL. A preparação dos inóculos seguiu as normas publicadas no documento

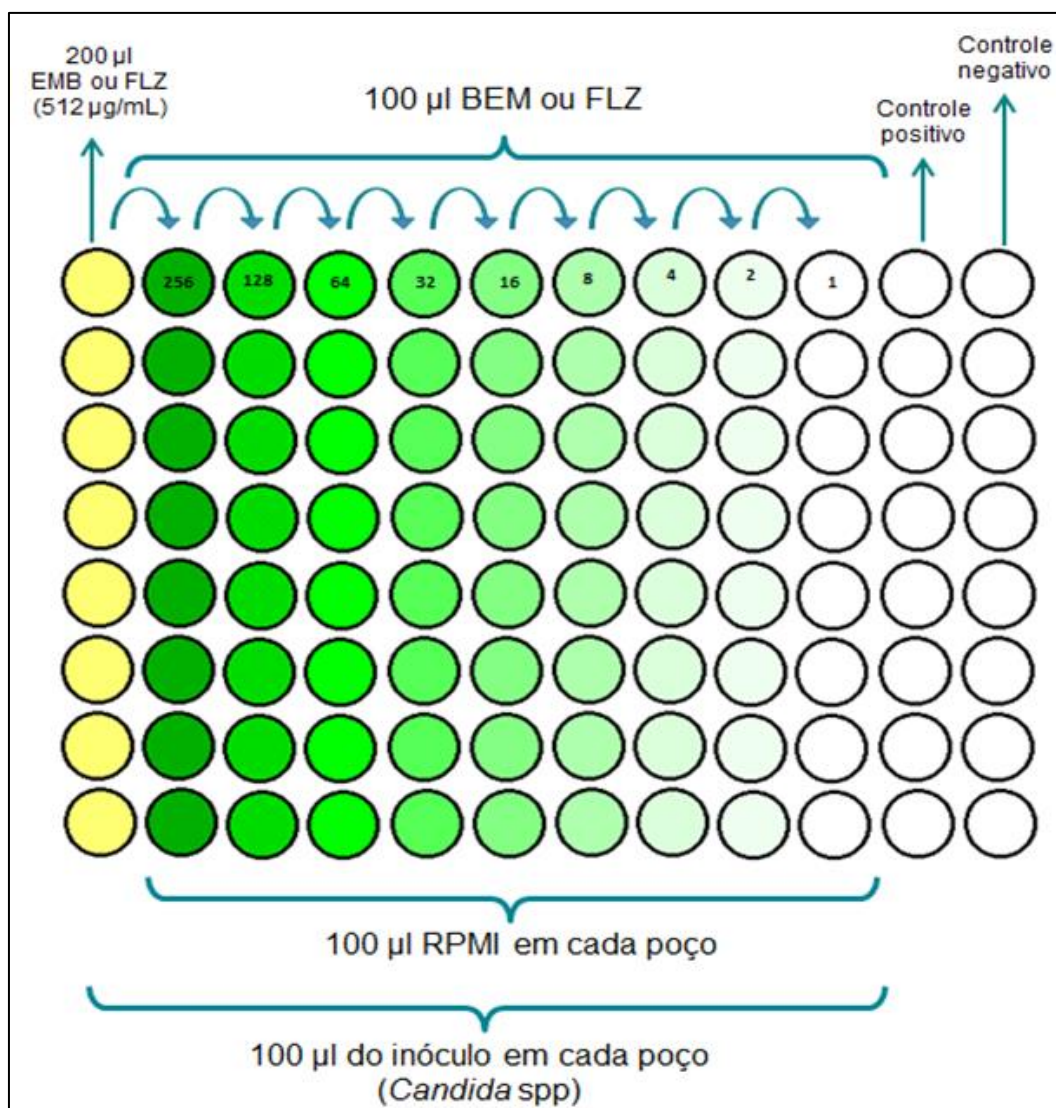
M27-A3 do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008), com atualizações no documento M27-S4 (Quarto Suplemento Informativo, 2012).

#### **4.3.3 Preparação das substâncias antifúngicas**

Devido à insolubilidade do EMB de *T. acutifolius* em água, utilizou-se Dimetilsulfóxido (DMSO) como agente solubilizante. Entretanto, conhecendo que a concentração final de solvente na solução de trabalho não pode ser superior a 2%, inicialmente preparou-se uma solução-mãe do extrato vegetal a uma concentração de 51.200 µg/mL, seguindo uma diluição 1:50 em caldo RPMI, reduzindo a concentração de solvente na solução de trabalho a 2% de DMSO (CLSI, 2008; 2012).

#### **4.3.4 Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

A fim de determinar a menor concentração capaz de impedir o crescimento visível de 100% (CIM100) das unidades formadoras de colônias dos isolados leveduriformes, realizou-se a técnica da microdiluição em caldo (CLSI, 2008; 2012), considerando a faixa de concentração de 1 µg/mL a 512 µg/mL. Resumidamente, a microdiluição em caldo foi realizada em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços (dispostos em 12 colunas e 8 linhas). Em cada poço da primeira coluna foram depositados 100 µl das substâncias antifúngicas duas vezes mais concentradas, seguindo com microdiluições seriadas em 100 µl de caldo RPMI 1640 da segunda até a décima coluna. Então, 100 µL de cada inóculo foram depositados nos poços já contendo igual volume do respectivo agente antifúngico. Na décima primeira coluna foi feito o controle positivo, adicionando 100 µL de caldo RPMI 1640 e 100µL de inóculo; e, na décima segunda coluna, o controle negativo, onde foi adicionando apenas 200 µL de meio RPMI 1640 servindo como controle de esterilidade do ensaio (Figura 7).



**Figura 7.** Microdiluição seriada para avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do EMB de *T.acutifolius*.

A definição de suscetibilidade de cada isolado seguiu os parâmetros de susceptibilidade ao fluconazol (FLC) recomendado pelo protocolo M27-S4 (CLSI, 2012) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Breakpoints para definição do fenótipo de suscetibilidade dos isolados frente ao fluconazol, conforme M27-S4 (CLSI, 2012).

Espécie	S	Fenótipo SDS	R
<i>Candida albicans</i>	≤2	4	≥8
<i>Candida glabrata</i>	--	≤32	≥64
<i>Candida krusei</i>	--	--	--
<i>Candida parapsilosis</i>	≤2	4	≥8
<i>Candida tropicalis</i>	≤2	4	≥8

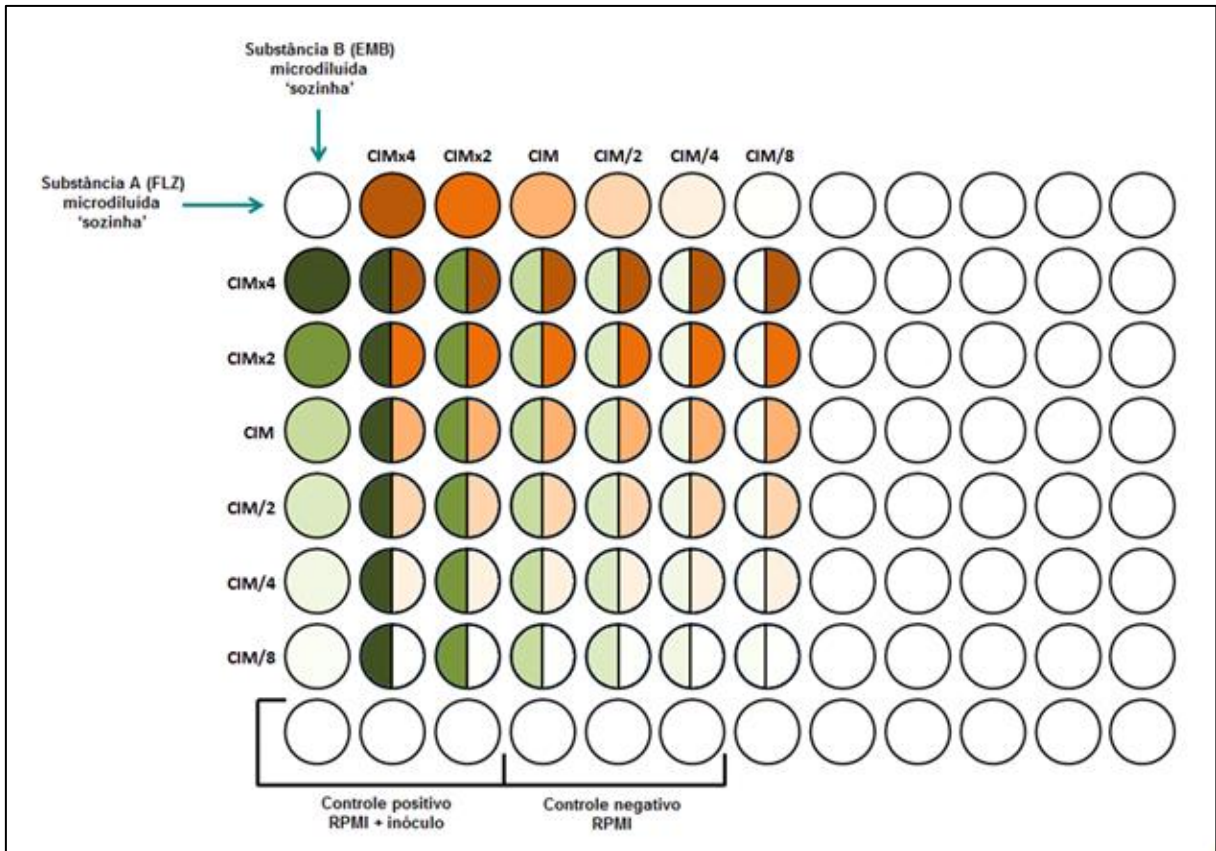
Legenda: S, sensível; SDD, suscetível dose-dependente; R, resistente; --, fenótipo não definido.

Por fim, as microplacas foram incubadas a 35 °C por 48 horas, com posterior leitura e determinação da CIM. Os ensaios foram realizados em duplicata.

#### **4.3.5 Ensaio checkerboard**

O ensaio de *checkerboard* é um dos métodos mais empregados para caracterizar a interação entre antifúngicos e produtos naturais, caracterizando a interação entre as substâncias como sinérgica, indiferente ou antagonista (Johnson et al., 2004).

Inicialmente foi necessário conhecer a CIM50 do fluconazol, ou seja, qual a menor concentração capaz de impedir o crescimento visível de 50% das unidades formadoras de colônia dos isolados selecionados. Para isso, também realizou-se a técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2008; 2012). Posteriormente, conhecendo a CIM100 do extrato vegetal bruto e a CIM50 do fluconazol (FLC), realizou-se o ensaio de *checkerboard* (Johnson et al., 2004), com modificações, utilizado para caracterizar combinações antimicrobianas *in vitro*. Resumidamente, este ensaio foi realizado em duplicata em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços, utilizando a padronização de inóculo já citada anteriormente e caldo RPMI 1640 como meio. As concentrações do EMB e do FLC foram selecionadas baseadas nos valores da CIM previamente determinadas, considerando, para cada substância, concentrações duas vezes mais altas e concentrações três vezes mais baixas do que o valor de CIM para cada isolado, ou seja, CIM\*4, CIM\*2, CIM, CIM/2, CIM/4 e CIM/8, gerando um gradiente de concentração das CIM previamente encontrados. Como controle de cada substância antifúngica, foi realizado, nos poços A2 a A7, o gradiente da CIM do FLC; e, nos poços B1 a G1, o gradiente de CIM do EMB. Nos poços B2 a B7, C2 a C7, D2 a D7, E2 a E7, F2 a F7 e G2 a G7, foi realizada a combinação das substâncias nas diferentes concentrações. Os poços H1 a H3 foram utilizados para controle positivo, adicionando caldo RPMI 1640 e inóculo; e, os poços H4 a H6 para controle negativo, adicionando apenas caldo RPMI 1640 (Figura 8).



**Figura 8.** Ensaio de *checkerboard* para determinação do tipo de interação entre a substância sintética e o extrato vegetal bruto.

As microplacas foram incubadas a 35 °C por 48 horas, com posterior leitura e determinação do Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF).

O ICIF avalia interação entre os diferentes tratamentos e foi calculado de acordo com a equação 1 (Johnson et al., 2004).

**Equação 1.** Cálculo para determinação do Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF).

$$ICIF = \frac{CIM \text{ (antimicrobiano A em combinação com B)}}{CIM \text{ do antimicrobiano A sozinho}} + \frac{CIM \text{ (antimicrobiano B em combinação com A)}}{CIM \text{ do antimicrobiano B sozinho}}$$

Onde, neste caso, o antimicrobiano A foi o fluconazol e o antimicrobiano B foi o EMB. A partir dos valores de ICIF obtidos, foi possível classificar os tipos de interação entre as substâncias, conforme apresentado na Tabela 3 (Johnson et al., 2004).

**Tabela 3.** Classificação dos tipos de interação entre substâncias antimicrobianas, conforme Johnson et al (2004).

ICIF	Interação
$\leq 0,5$	Sinérgica
$0,5 > \text{ICIF} < 4,0$	Indiferente
$\geq 4,0$	Antagônica

#### **4.4 Ensaios toxicológicos**

##### **4.4.1 Avaliação da viabilidade celular**

###### **4.4.1.1 Seleção da linhagem celular**

O ensaio toxicológico para avaliação da viabilidade celular foi realizado em células humanas imortalizadas, utilizando a linhagem HaCaT, queratinócitos de origem ATCC, gentilmente cedida pelo Laboratório de Biologia Celular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Optou-se por esta linhagem celular, pois queratinócitos constituem o principal tipo celular da pele, sendo alvo das alterações mediadas pelos diferentes tipos de estresse.

###### **4.4.1.2 Preparação da substância**

Da mesma forma como realizado na preparação do EMB de *T. acutifolius* para os ensaios microbiológicos, o mesmo foi solubilizado em DMSO, obtendo-se uma solução-estoque a uma concentração de 25,6 mg/mL. A faixa de concentração testada foi de 1 µg/mL a 256 µg/mL, obtidas por diluições seriadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado, não ultrapassando 1% de DMSO em cada diluição.

###### **4.4.1.3 Cultivo Celular**

As células HaCaT foram cultivadas em meio DMEM, contendo 4,5 g/L de L-glutamina/Glicose e 3,7 g/L de bicarbonato de sódio, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução Penicilina/Estreptomicina, conforme metodologia de López-García e colaboradores (2014), com modificações. As células foram incubadas em estufa a 37 °C, atmosfera umidificada e com 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem confluência de ~80%.

###### **4.4.1.4 Tratamento das células**

O tratamento das células foi realizado em microplacas de poliestireno estéreis de 96 poços microplacas, seguindo o protocolo ISO 10993-5 (2009), com



modificações. Uma alíquota de  $5 \times 10^3$  células/mL foi semeada em cada poço das microplacas e as mesmas incubadas a 37 °C, atmosfera umidificada e com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas em cultura e confluência de 70-80%, o meio DMEM suplementado foi retirado e uma alíquota de 100 µl de cada concentração do EMB de *T. acutifolius* foi adicionado em cada poço do microplaca. Poços com células não tratadas foram utilizados como controle positivo de crescimento celular e poços tratados com DMSO foram utilizados como controle do veículo. Após 24 de incubação, as células foram lavadas em tampão PBS, tripsinizadas e ressuspensas. Então, uma alíquota de 50 µl de MTT a 1 mg/mL foi adicionado em cada poço e as placas foram novamente incubadas por 2 horas. Após, o meio contendo MTT foi descartado e 100 µl de DMSO foi adicionado em cada poço. A placa foi homogeneizada e transferida para uma leitora de microplacas, onde a formação de cristais de formazan, diretamente proporcionais à quantidade de células viáveis, foi mensurada por absorvância a 492 nm. As porcentagens de viabilidade (%) foram calculadas de acordo com a equação 2, utilizando a média aritmética dos ensaios.

**Equação 2.** Cálculo para obtenção dos percentuais de viabilidade celular, de acordo com os valores de absorvância obtidos para cada amostra.

$$\% \text{ de viabilidade celular} = \left( \frac{\text{Absorvância das células das amostras}}{\text{Absorvância das células do controle positivo}} \right) \times 100$$

Para determinação da viabilidade celular, também seguiu-se a ISO 10993-5 (2009), onde a substância foi classificada como não-citotóxica ou potencialmente citotóxica a partir da comparação com o controle positivo de crescimento (DMEM), considerando que uma redução de até 30% da viabilidade celular caracteriza a substância como não citotóxica.

#### **4.4.2 Avaliação do grau de irritação de mucosa**

##### **4.4.2.1 Ensaio HET-CAM**

Um dos fenômenos observados nos testes *in vivo* de irritação de mucosas (e.g. teste de irritação ocular, testes de irritação de mucosa oral, peniana, vaginal etc) é o aparecimento de alterações vasculares. O método HET-CAM (Hens Egg Test-Chorion Allantoide Membrane) (Luepke, 1985) surgiu como alternativa em avaliar o grau de irritação de mucosas induzido por substâncias químicas, apresentando boa

correlação com os resultados obtidos nos testes in vivo, uma vez que este permite a avaliação imediata de fenômenos vasculares, tais como hiperemia, hemorragia e coagulação.

A fim de avaliar o potencial irritante do EMB de *T. acutifolius* realizou-se o ensaio da membrana cório-alantóide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM). Para tanto, foram empregados ovos brancos férteis Lohmann (Lohmann selected Leghorn, LSL). Os ovos foram mantidos em condições otimizadas de incubação (temperatura entre 38 e 39 °C e umidade entre 55 e 60% durante 10 dias). No décimo dia, a casca do ovo, em torno do espaço aéreo, foi cuidadosamente removida com auxílio de ferramenta rotativa (Dremel, WI). Posteriormente, adicionou-se 300 µL de cada concentração do extrato vegetal em cada ovo (diluída em solução salina 0,9%), a saber: 4, 8, 16, 32, 64 e 128 µg/mL. Utilizou-se solução salina a 0,9% como controle negativo e solução 0,1 M de NaOH como controle positivo. O efeito irritante foi observado em períodos de 30 segundos, 2 e 5 minutos após a aplicação. O resultado do escore de irritação (IS, do inglês *Irritation Score*) foi atribuído de acordo com a equação 3, em uma escala onde 0 a 4,9 determinava a substância como de natureza não irritante (ou praticamente nenhuma irritação), e 5,0 a 21 como de natureza irritante (moderada/grave ou irritação extrema) (ICCVAM, 2010).

**Equação 3.** Cálculo para determinação do escore de irritação (IS).

$$IS = \left( \left( \frac{301 - \text{Tempo de hemorragia}}{300} \right) \times 5 \right) + \left( \left( \frac{301 - \text{Tempo de lise}}{300} \right) \times 7 \right) + \left( \left( \frac{301 - \text{Tempo de coagulação}}{300} \right) \times 9 \right)$$

#### **4.4.3 Avaliação de dano tecidual**

##### **4.4.3.1 Ensaio histopatológico**

Foram utilizadas amostras de tecidos de porcos machos adultos, recentemente abatidos, para avaliar a formação de dano tecidual devido à ação do extrato vegetal de *T. acutifolius*. Os porcos foram abatidos de acordo com as regras do Ministério da Agricultura brasileiro, respeitando o bem-estar dos animais (Brasil, 2013). A pele da orelha dos porcos foi utilizada neste estudo. Os tecidos foram removidos dentro de um período de 5 minutos após o abate, os cabelos foram cuidadosamente removidos por um cortador elétrico e transportados para o laboratório em tampão Krebs-Hepes gelado. As amostras de pele foram montadas em células de difusão de Franz (Logan Instrument Corp., NJ) com a área de difusão de aproximadamente 1,75 cm<sup>2</sup>. O lado

epidérmico da pele foi exposto a um tampão PBS pH 7,0 (controle negativo) e a solução 0,1 M de NaOH (controle positivo) por um período de 6 horas. O EMB foi dissolvido no tampão PBS pH 7,0 nas concentrações de 4, 8, 16, 32, 64 e 128 µg/mL. O lado epidérmico da pele foi submetido ao contato com estas soluções por um período de 6 horas. Fragmentos desses tecidos foram colhidos, fixados em 10% de formalina tamponada neutra, processados rotineiramente e corados com hematoxilina e eosina (HE) e examinados sob microscopia óptica. Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### **4.5 Avaliação Fitoquímica**

O perfil fitoquímico do EMB de *T. acutifolius* foi realizado através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), de acordo com Coelho e colaboradores (2018), com modificações. Utilizou-se um cromatógrafo Shimadzu LC-10 (Tokyo, Japão) equipado com bomba LC-20AT, auto-injetor SIL-20A com detector de arranjo de diodo (DAD) SPD-M20A. A separação foi realizada com uma coluna Gemini 5 µm C-18 (250 x 4,66 mm) (Phenomenex®). A fase móvel foi constituída por um sistema de gradiente linear contendo água ultrapura e ácido fosfórico 1% (A), como fase polar; e, metanol grau cromatográfico (B), como fase orgânica. A composição deste gradiente foi de 13% de fase móvel B até 10 minutos, aumentando para 20%, 30%, 50%, 60%, 70%, 20% e 13% de B em 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 min, respectivamente, em um fluxo de 0,7 mL/min, um volume de injeção de 10 µL e com o forno a 40 °C.

A determinação qualitativa dos compostos foi realizada a partir da comparação com os tempos de retenção (Tr), sobreposição dos espectros e comparação dos máximos de absorção no ultravioleta (UV) com os padrões referências disponíveis - ácido gálico, catequina, rutina e quercetina da marca Sigma. Os espectros de cada padrão e amostra foram analisados por varredura no ultravioleta, onde os seguintes comprimentos de onda foram considerados para cada padrão: ácido gálico em 271 nm, catequina em 280 nm, rutina em 255 nm e quercetina em 371 nm. O extrato vegetal foi analisado em uma concentração de 10 mg/mL e os padrões referência a uma concentração de 1 mg/mL, todos solubilizados em metanol.

Antes de serem injetadas no cromatógrafo, a amostra e os padrões referência foram filtrados (membrana 0,45 µm) e sonicados por 30 minutos, para degaseificação. Em seguida, foram transferidos para os *vials* e inseridos no cromatógrafo.

A fim de verificar a presença do tripodantossídeo, realizou-se o fracionamento do EMB através de cromatografia de coluna de fase normal, utilizando sílica em gel 230-400 mesh ASTM (Merck, Darmstadt, Alemanha) e um gradiente de polaridade entre os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila (Neon, São Paulo, Brasil) e metanol (Panreac Química S.L.U, Castellar del Vallès, Espanha). As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotativo e novamente solubilizadas em metanol, para posterior leitura em CLAE, a uma concentração de 1 mg/mL. Após CLAE, selecionou-se para leitura em infravermelho apenas a fração melhor isolada e com tempos de retenção diferentes das SR, sendo esta potencialmente o composto de interesse. Esta fração foi então analisada por Reflexão Total Atenuada (acessório ATR) em equipamento Spectrum 400 FT-IR FT-NIR Perkin Elmer, na faixa de 4000-650  $\text{cm}^{-1}$ , oito pulsos de varredura e 30 psi de pressão gauge.

#### **4.6 Estatística**

Os resultados obtidos por meio do ensaio de *checkerboard* foram avaliados através de análise de variância *one-way ANOVA* (Software Origin® 6.0 Workin Model, Microcal™), avaliando a diferença entre a atividade antifúngica quando os agentes utilizados isoladamente e após a combinação EMB-FLC. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

#### **4.7 Descarte de resíduos**

O descarte dos resíduos respeitou as diretrizes e determinações locais de cada estabelecimento onde este estudo foi executado.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Ensaios microbiológicos

#### 5.1.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e *checkerboard*

Cinco espécies foram utilizadas para determinação da CIM do EMB de *T. acutifolius*, sendo dois isolados de cada espécie, mais um ATCC, totalizando onze isolados testados, onde o valor médio das CIM para FLC e o EMB, para os onze isolados, foi de 21,64 µg/mL e 27,64 µg/mL, respectivamente.

Seguindo os parâmetros de susceptibilidade ao fluconazol, recomendado pelo protocolo do CLSI (CLSI 2008; 2012), foi possível caracterizar dois isolados como 'sensível' (ATCC18804 e CpRL38), dois como 'suscetíveis dose dependente' (Cg09 e CgRL12m) e cinco como 'resistentes' (Ca01, Ca02, Ct57A, Ct94P e CpRL13m). Dois isolados não foram caracterizados com perfil de susceptibilidade (CkRL102 e CkRL52), pois o protocolo ainda não apresenta parâmetro para a espécie *C. krusei*. Os resultados do ensaio para determinação da CIM *in vitro* mostraram que o EMB de *T. acutifolius* apresentou atividade antifúngica (CIM100%) em concentrações que variaram de 16 a 64 µg/mL para os onze isolados leveduriformes testados, onde cinco isolados foram inibidos a uma concentração de 16 µg/mL, da mesma forma que cinco foram inibidos a 32 µg/mL e apenas um isolado inibido a uma concentração de 64 µg/mL do EMB (Tabela 4).

**Tabela 4.** Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) obtidos pelo FLC e pelo EMB de *T. acutifolius* quando testados separadamente e caracterização do perfil de suscetibilidade.

Espécie	Isolado	CIM FLC (µg/mL)	CIM EMB (µg/mL)
<i>Candida albicans</i>	ATCC 18804 <sup>S</sup>	2	32
	Ca01 <sup>R</sup>	32	16
	Ca02 <sup>R</sup>	8	32
<i>Candida glabrata</i>	Cg09 <sup>SDD</sup>	32	64
	CgRL12m <sup>SDD</sup>	32	16
<i>Candida krusei</i>	CkRL102	2	32
	CkRL52	32	16
<i>Candida parapsilosis</i>	CpRL38 <sup>S</sup>	2	32
	CpRL13m <sup>R</sup>	16	16
<i>Candida tropicalis</i>	Ct57A <sup>R</sup>	16	32
	Ct94P <sup>R</sup>	64	16
<b>Média</b>		21,64	27,64

Legenda: S, sensível; SDD, suscetível dose-dependente; R, resistente.

Dos cinco isolados caracterizados como resistentes, dois apresentaram diminuição da CIM para o EMB em relação àquela apresentada pelo FLC (Ca01 e Ct94P). O EMB fez a CIM exigida pelo isolado Ca01 diminuir em 1X (de 32 µg/mL para 16 µg/mL) e a CIM exigida pelo isolado Ct94P diminuir em 2X (de 64 µg/mL para 16 µg/mL). Ainda em comparação com os valores obtidos para FLC, o EMB fez diminuir em 1X a CIM exigida pelo isolado CgRL12m, caracterizado como dose-dependente (de 32 µg/mL para 16 µg/mL), assim como para o isolado CkRL52, porém este ainda não apresenta parâmetro de susceptibilidade.

Através do ensaio *checkerboard* foi avaliada o tipo de interação entre o EMB de *T. acutifolius* e o fármaco fluconazol para dez isolados, onde o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) variou entre 0,3125 a 1,25, indicando interação indiferente ou sinérgica. Quatro destes isolados apresentarem interação sinérgica em resposta à combinação entre FLC e o EMB (Cg09, CgRL12m, Ct57A e Ct94P), entretanto todos os dez isolados apresentaram uma diminuição da CIM exigida pelo fármaco sintético após este ser combinado com o EMB (Tabela 5).

**Tabela 5.** Novos valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) obtidos para o FLC e o EMB de *T. acutifolius* após a combinação entre os mesmos, com respectivos valores de Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) e tipos de interação.

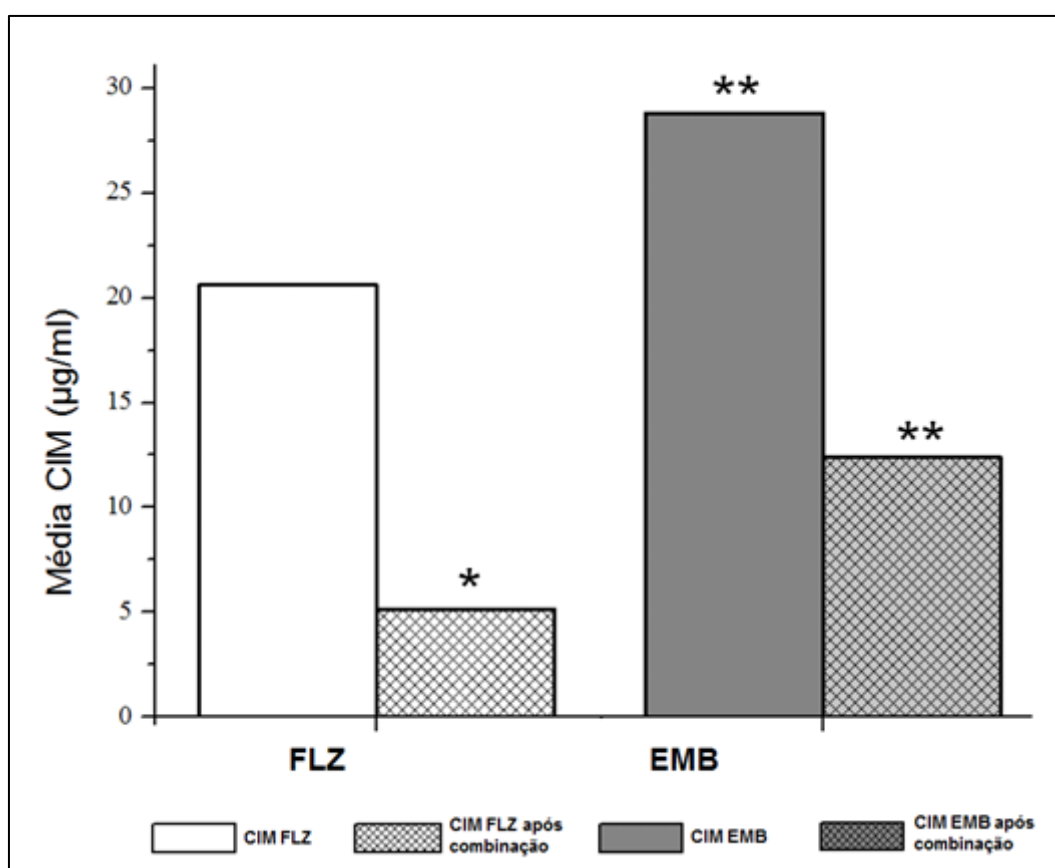
Espécie	Isolado	CIM combinada (µg/mL)		ICIF	Interação
		FLC	EMB		
<i>Candida albicans</i>	ATCC 18804	1	16	1	Ind
	Ca02	1	32	1,125	Ind
<i>Candida glabrata</i>	Cg09	8	4	0,3125	Sin
	CgRL12m	8	4	0,5	Sin
<i>Candida krusei</i>	CkRL102	1	16	0,5625	Ind
	CkRL52	16	4	0,75	Ind
<i>Candida parapsilosis</i>	CpRL38	0,5	32	1,25	Ind
	CpRL13m	8	8	1	Ind
<i>Candida tropicalis</i>	Ct57A	4	4	0,375	Sin
	Ct94P	4	4	0,3125	Sin
<b>Média</b>		5,15	12,4		

Legenda: Ind, indiferente; Sin, sinergismo.

Ressalta-se que a CIM de FLC para Ca02, Ct57A e Ct94P era de 8, 16 e 64, respectivamente, caracterizando-os como isolados resistentes. Quando este antifúngico foi combinado com o EMB, a sua CIM foi reduzida para 1 µg/mL (em Ca02) e 4 µg/mL (em Ct57A e Ct94P), revertendo o perfil de resistência. De modo geral, FLC e o EMB diminuíram seus valores de CIM após a combinação entre ambos.

Considerando os valores obtidos para os dez isolados selecionados para o

ensaio *checkerboard*, a média da CIM para o FLC e para o EMB, quando utilizados separadamente, foi de 20,6 e 28,8  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Após o tratamento combinado entre as duas substâncias, esses valores diminuíram, passando a uma média de CIM de 5,15  $\mu\text{g/mL}$  para FLC e 12,4  $\mu\text{g/mL}$  para o EMB, conforme Figura 9. Além disso, através da análise de variância ANOVA, com intervalo de confiança de 95% ( $p=0,05$ ), foi possível observar que houve diferença significativa entre os valores de CIM obtidos somente pelo FLC e aqueles valores obtidos após este ser combinado com o EMB ( $p= 0,02744$ ), assim como entre a CIM obtida somente pelo EMB e após este ser combinado com o FLC ( $p=0,01212$ ). Não sendo encontrada diferença significativa nos valores das CIM entre as substâncias testadas separadamente ( $p=0,30628$ ), assim como entre os valores das CIM obtidas somente pelo FLC com aqueles valores obtidos pelo EMB após este ser combinado com o FLC ( $p=0,27033$ ) (Figura 9).



**Figura 9.** Comparação entre a média das CIM obtidas quando substâncias testadas separadamente e após as mesmas serem testadas em combinação. A diferença entre os tratamentos foi avaliada através da comparação com a média das CIM obtidas somente pelo fluconazol (One-Way ANOVA): \*  $p<0,05$  e \*\*  $p>0,05$ . Onde, CIM: concentração inibitória mínima; FLC: fluconazol; e, EMB: extrato metanólico bruto.

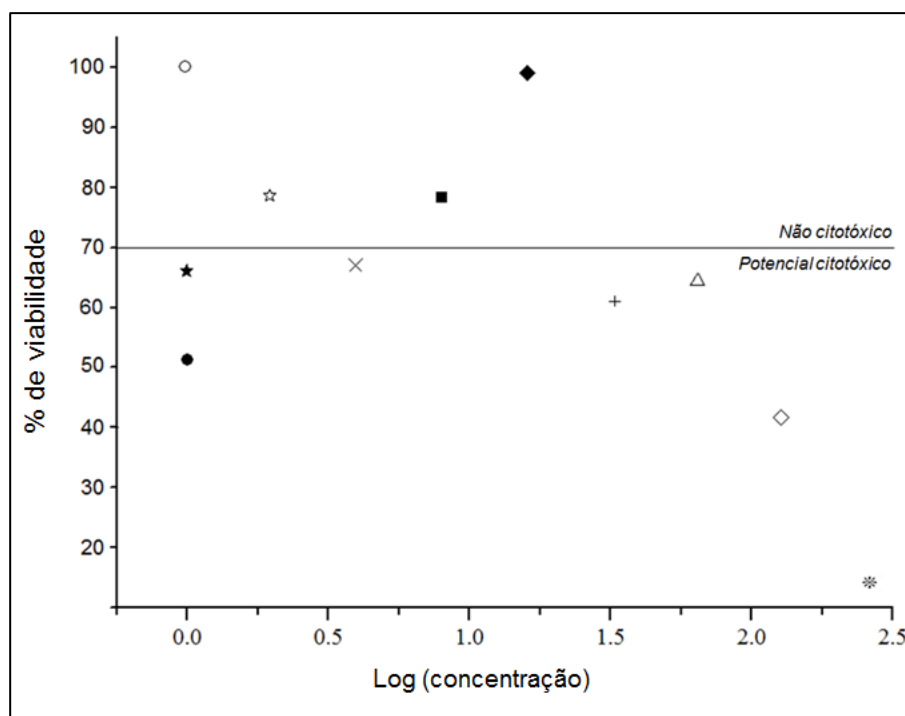
## 5.2 Ensaios toxicológicos

### 5.2.1 Viabilidade celular

A citotoxicidade de cada concentração do EMB de *T. acutifolius* foi quantificada como uma porcentagem da viabilidade celular, que considerou os valores de absorvância obtidos para cada sistema.

As concentrações de 1, 4, 32 e 64, 128 e 256 µg/mL apresentaram 66,3%, 66,1, 61,5%, 63,8%, 41,4 % e 13,89% de viabilidade, respectivamente, indicando potencial citotóxico. Já as concentrações de 2, 8, e 16 µg/mL, apresentaram 78,7%, 78,2%, 98,7%, respectivamente, de viabilidade, indicando não citotoxicidade. O controle do veículo, DMSO, apresentou 51,6% de viabilidade celular, ou seja, menor viabilidade do que as concentrações testadas, indicando que sua concentração não é interferente nos resultados.

A Figura 10 mostra a relação entre o percentual de viabilidade (eixo y) e os logaritmos das concentrações do extrato vegetal (eixo x).

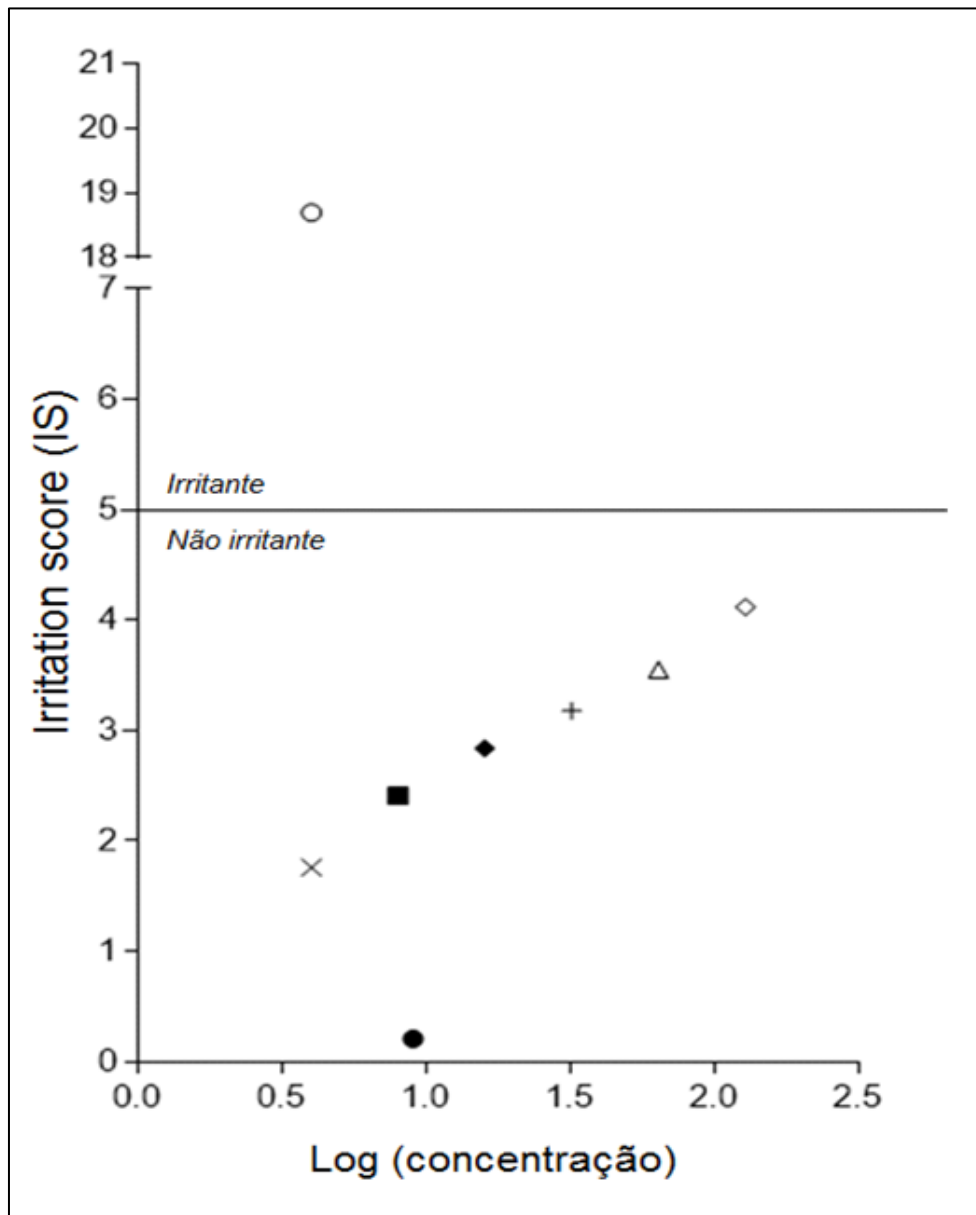


**Figura 10.** Relação dose-resposta do EMB de *T. acutifolius* no ensaio para avaliação da viabilidade celular em linhagem HaCat no período de 24 horas: (★) concentração 1 µg/mL; (☆) concentração 2 µg/mL; (×) concentração 4µg/mL; (■) concentração 8 µg/mL; (♦) concentração 16 µg/mL; (+) concentração 32µg/mL; (Δ) concentração 64 µg/mL; (◇) concentração 128 µg/mL; (\*) concentração 256 µg/mL; (●) controle do veículo (DMSO); e, (o) controle positivo (DMEM). Cada ponto representa a média das triplicatas dos dois ensaios independentes.



### 5.2.2 Ensaio HET-CAM

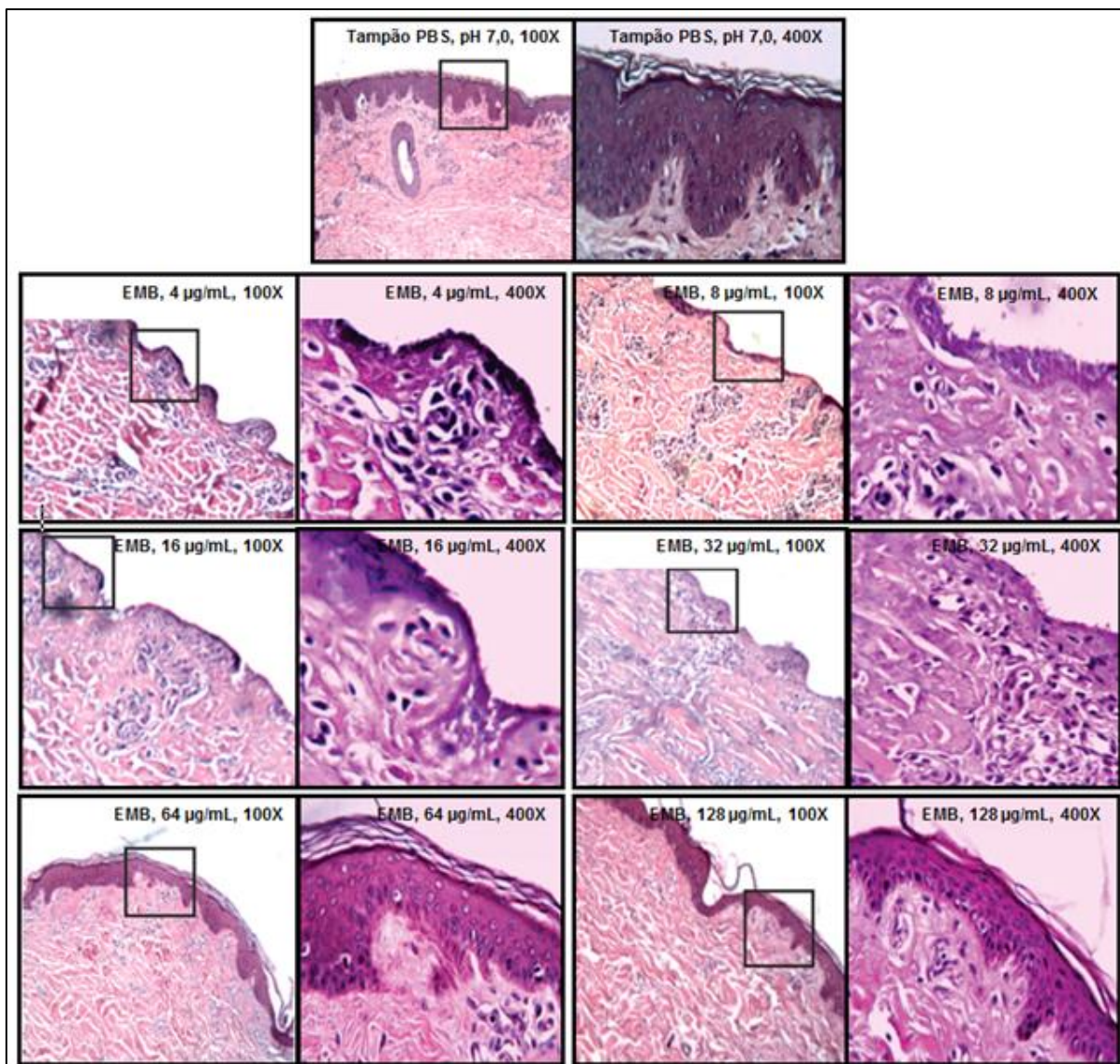
O índice de irritação nas concentrações de 4, 8, 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g/mL}$  foi de 1,76, 2,41, 2,84, 3,18, 3,55 e 4,12, respectivamente, todos inferiores a 5,0, caracterizando o EMB de *T. acutifolius* como não irritante, pela metodologia utilizada. A Figura 11 mostra a relação entre IS (eixo y) e os logaritmos das concentrações do extrato vegetal e dos controles (eixo x).



**Figura 11.** Relação dose-resposta do EMB de *T. acutifolius* no ensaio para avaliação do grau de irritação de mucosa (HET-CAM): (x) concentração 4  $\mu\text{g/mL}$ ; (■) concentração 8  $\mu\text{g/mL}$ ; (◆) concentração 16  $\mu\text{g/mL}$ ; (+) concentração 32  $\mu\text{g/mL}$ ; (Δ) concentração 64  $\mu\text{g/mL}$ ; (◇) concentração 128  $\mu\text{g/mL}$ ; (●) controle negativo (0,9% NaCl); e, (o) controle positivo (0,1 NaOH). Cada ponto representa um experimento (n=três ovos).

### 5.2.3 Ensaio histopatológico

O resultado da avaliação histopatológica da pele da orelha de porco incubada com as seis diferentes concentrações do EMB de *T. acutifolius* não apresentou lesões teciduais microscópicas, conforme Figura 12.



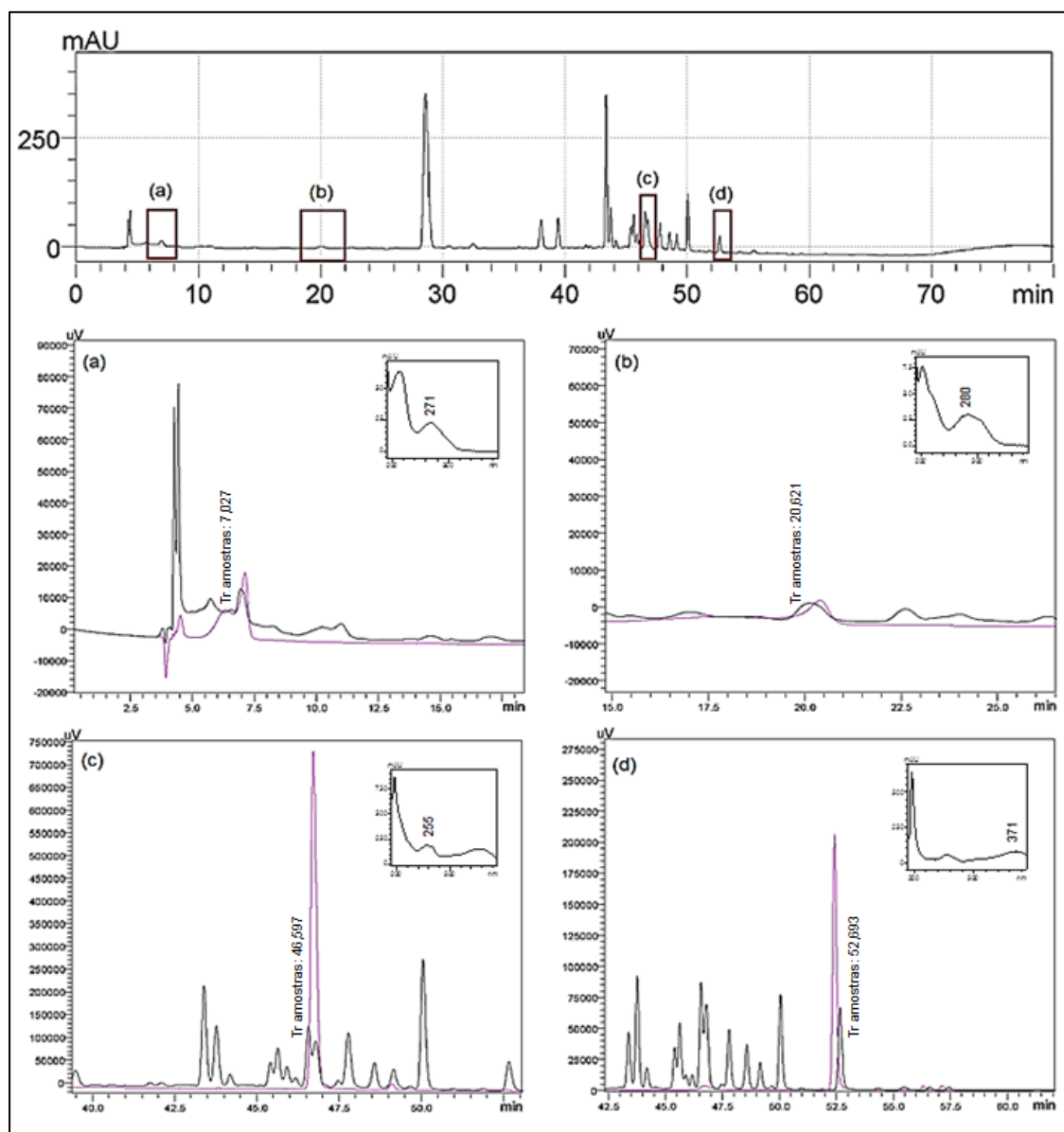
**Figura 12.** Avaliação do dano tecidual através de ensaio histopatológico em células epidérmicas suínas tratadas com o EMB de *T. acutifolius* e controle negativo, em aumento de 100 e 400 vezes.

### 5.3 Avaliação fitoquímica

A partir de 16 g de material vegetal seco foi obtido 5,3 g de EMB, o que corresponde a um rendimento de 33,125%.

Na identificação qualitativa do EMB por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), através da comparação dos tempos de retenção (Tr) e da

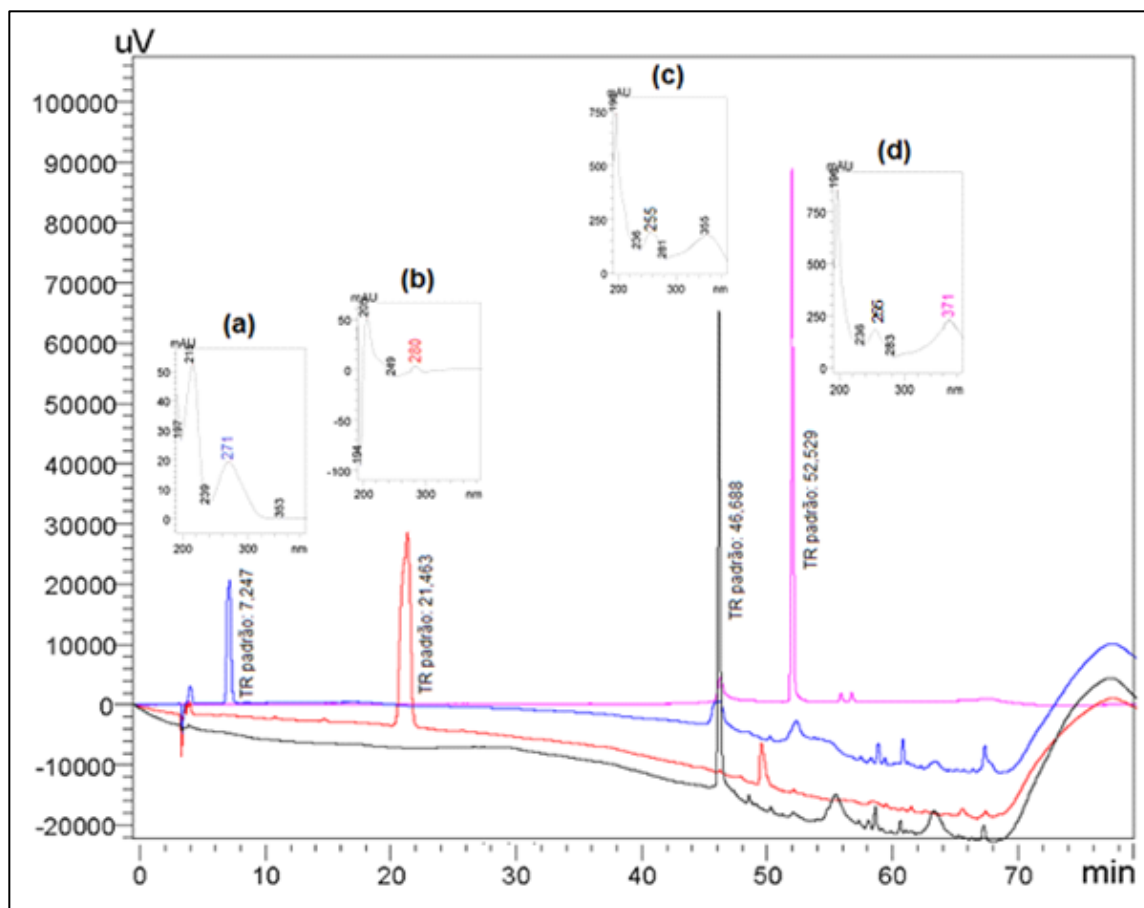
sobreposição dos espectros, além da comparação dos máximos de absorção no ultravioleta (UV) com os padrões referências disponíveis, foi possível identificar quatro compostos no extrato: (a) ácido gálico, (b) catequina, (c) rutina e (d) quercetina (Figura 13).



**Figura 13.** Cromatogramas evidenciando os tempos de retenção, sobreposição com os padrões de referência (em rosa) e máximos de absorção no UV para cada composto identificado no EMB de *T. acutifolius*: **(a)** ácido gálico, **(b)** catequina, **(c)** rutina e **(d)** quercetina, nos respectivos comprimentos de onda selecionados.

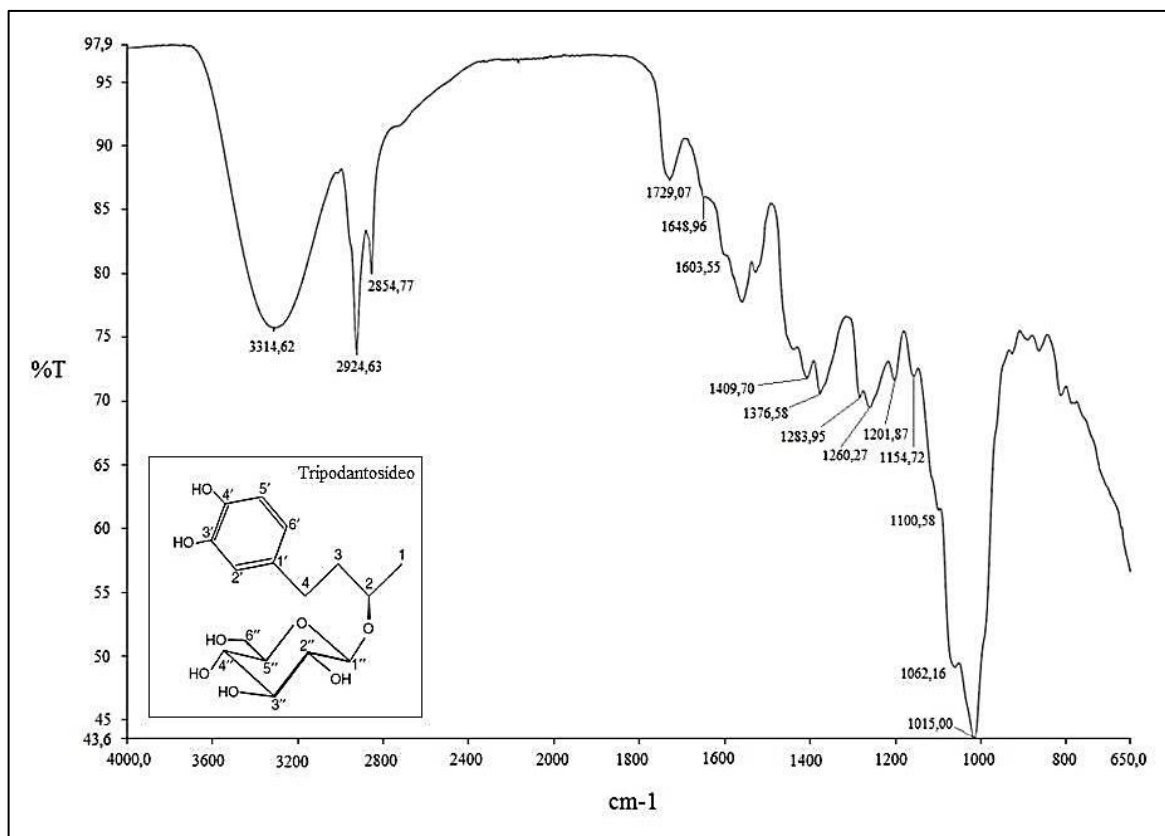
Para comparação, uma análise mais detalhada dos padrões analisados encontra-se abaixo (Figura 14), evidenciando seus respectivos Tr e bandas de absorção no UV, onde: ácido gálico (Tr = 7,247 min; UV = 271 nm), catequina (Tr =

21,463 min, UV = 280 nm), rutina (Tr = 46,688 min, UV = 255 nm e 355 nm) e quercetina (Tr = 52,529 min, UV = 255 nm e 371 nm).



**Figura 14.** Cromatograma, espectros de absorção no UV e tempos de retenção dos padrões referência: (a) ácido gálico, (b) catequina, (c) rutina e (d) quercetina.

Em relação a análise infravermelho, as bandas identificadas na fração isolada foram:  $3314,62\text{ cm}^{-1}$  atribuída à  $\nu$  O-H;  $2924,63$  e  $2854,87\text{ cm}^{-1}$  atribuídas à  $\nu$  C-H de  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ ;  $1729,07\text{ cm}^{-1}$  atribuída à  $\nu$  C=C;  $1648,96\text{ cm}^{-1}$  atribuída  $\delta$  C=C;  $1603,55\text{ cm}^{-1}$  atribuída a  $\nu$  C-C aromático;  $1409,70$  e  $1376,58\text{ cm}^{-1}$  atribuídas a  $\delta$  O-H;  $1283,95$  e  $1260,27\text{ cm}^{-1}$  atribuídas a  $\delta$  C-O;  $1154,72\text{ cm}^{-1}$  atribuída a  $\nu$  HC-O-CH; e,  $1201,87$ ,  $1100,58$ ,  $1062,16$  e  $1015,00\text{ cm}^{-1}$  atribuídas a  $\delta$  C-OH (Pretsch et al., 1989; Silverstein et al., 2007), conforme Figura 15.



**Figura 15.** Espectro infravermelho da fração metanólica isolada a partir de cromatografia de coluna de fase normal, com respectivas bandas de absorção. No detalhe, molécula correspondente ao tripodantosídeo.

## 6 DISCUSSAO

Nas últimas décadas houve um aumento considerável no número de infecções ocasionadas por espécies do gênero *Candida* resistentes aos agentes antifúngicos atualmente existentes (Tortorano et al., 2006; Pfaller e Diekema, 2012).

Estas leveduras têm grande importância pela alta frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano, tornando-se altamente patogênicas, caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou comprometimento de barreiras anatômicas, podendo levar a infecções superficiais ou invasivas, como infecções mucocutâneas, a infecções mais agressivas como endocardite, meningite e peritonite, aumentando assim os índices de morbidade e mortalidades, principalmente dos pacientes imunocomprometidos (Colombo e Guimarães, 2003; Martins et al., 2015; Deorukhkar e Saini, 2016).

Dentre os antifúngicos mais utilizados para combater as infecções ocasionadas por *Candida* spp., destaca-se o grupo dos azóis, considerados antifúngicos de primeira linha para o tratamento de micoses superficiais e invasivas humanas (Müller et al., 2007). Além disso, os azóis são muito utilizados na agricultura e na viticultura para controle do crescimento de fungos em plantas e frutas, o que pode levar ao desenvolvimento de resistência aos microrganismos na medicina humana (Müller et al., 2007). Em vista disso, observa-se um aumento anual da incidência de cepas resistentes, onde o uso indiscriminado e excessivo destes agentes antifúngicos acelera o processo de aquisição de resistência, tornando o arsenal antimicrobiano existente atualmente cada vez mais limitado (O'Neill, 2014).

Neste sentido, produtos de origem natural são considerados alternativas atrativas ao aumento da resistência aos antimicrobianos de origem sintética, uma vez que apresentam fácil acessibilidade, eficiência, segurança e baixo custo (Hirasawa e Takada, 2004; Rosato et al., 2008; Shokri et al., 2011; Pippi et al., 2015).

Atualmente há diversos relatos bem-sucedidos com extratos, frações e moléculas isoladas de plantas que apresentam atividade contra as diferentes espécies de *Candida* (Moraes et al., 2015; Correia et al., 2016; Salari et al., 2016; Machado et al., 2016). A comprovação de propriedades farmacológicas em plantas, através destes estudos, leva a um maior interesse e procura por produtos fitoterápicos. No mercado, podemos encontrar uma diversidade destes artigos indicados para prevenção ou

como tratamento alternativo às infecções ocasionadas por *Candida* spp., como óvulos vaginais de própolis verde (Phama Nectar), óleo essencial de malaleuca (Phytoterapica), sabonetes íntimos a base de malaleuca (PachaMama) e creme vaginal de barbatimão e melaleuca (Doce Erva). Além destes, facilmente encontram-se cápsulas fitoterápicas cuja formulação é baseada em uma mistura de compostos naturais com reportada atividade anti-*Candida* como canela, orégano, *Aloe Vera*, sementes de anis, entre outros (Candaway - Lamberts®, Candida Complex – Supplmets You, Candida Away – Heath Solution Prime, Candida Go - Vitaana Health).

Tal atividade biológica está intimamente relacionada à composição química destas plantas, principalmente aos compostos de seu metabolismo secundário, como compostos fenólicos (Soberón et al., 2010c; Seleem et al., 2016).

Através da análise química do extrato metanólico bruto (EMB) das folhas de *T. acutifolius* realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi possível comprovar a presença de quatro compostos fenólicos: ácido gálico, catequina, rutina e quercetina. Além da comparação entre os tempos de retenção, máximos de absorção no UV e sobreposição com os padrões referência, a presença destes quatro compostos pode ser comprovada através da literatura. Os máximos de absorção apresentados por ácido gálico (271 nm), catequina (280 nm), rutina (255 nm) e quercetina (371 nm) estão de acordo com relatos da literatura, que apresentam para ácido gálico, catequina, rutina e quercetina bandas de absorção no UV em 273 nm, 280 nm, 257 nm e 372 nm, respectivamente (Pawar e Salunkhe, 2013; Neilson et al, 2006; Chaudhari et al., 2014).

A presença destes compostos está de acordo com o encontrado por Ricco e colaboradores (2008), Wagner e colaboradores (2009), Soberón e colaboradores (2007, 2010a, 2010b, 2010c), Grüner e colaboradores (2014), Silva (2014) e Coelho e colaboradores (2018) que também identificaram ácido gálico, catequina, quercetina e rutina nos extratos obtidos de *T. acutifolius*. Embora não comprovado neste estudo a presença de demais compostos, o pico apresentado no cromatograma com Tr em 43,399 minutos, sugere a presença de um composto fenólico, uma vez que os máximos de absorção no UV para este pico foram de 255 e 354 nm. De acordo com Gaitén e colaboradores (2010) flavonoides, especialmente flavonóis e flavonas, apresentam dois picos de absorção no UV/VIS: uma banda na faixa de 250-285 nm e outra na faixa de 320-385 nm. Além da identificação deste compostos, a análise em

espectroscopia no infravermelho sugeriu que a fração metanólica, obtida por cromatografia de coluna de fase normal, corresponde ao tripodantosídeo, uma vez que esta apresentou bandas de absorção compatíveis com das ligações encontradas na molécula.

Diversos estudos já comprovaram a atividade antimicrobiana para o extrato de *T. acutifolius* (Muñoz et al., 1999; Daud et al., 2005; Soberón et al., 2007; Soberón et al., 2010c, Silva, 2014; Souza et al., 2014), todos referentes, principalmente, à atividade antibacteriana, com relatos de atividade amebicida e antimalárica. Entretanto, nas principais bases de dados de pesquisa da literatura científica (Google Scholar, Periódicos da Capes, Science Direct, Scielo e PubMed) não foram encontrados estudos demonstrando a atividade antifúngica do extrato vegetal bruto de *T. acutifolius* contra espécies do gênero *Candida*. Apenas um estudo reporta a capacidade de diminuição das doses terapêuticas do fármaco Anfotericina B sobre *C. albicans* e *C. tropicalis*, atribuindo esta atividade a um composto isolado, o tripodantosídeo (Soberon et al., 2011). Assim, o presente estudo torna-se um dos primeiros a pesquisar a propriedade anti-*Candida* no extrato metanólico bruto das folhas de *T. acutifolius*.

A atividade antifúngica do EMB das folhas de *T. acutifolius* foi determinada a partir da CIM pelo método de microdiluição em caldo, padronizado pela CLSI (CLSI, 2008; 2012) sendo este muito recomendado por ser um método padronizado e que permite a comparação interlaboratorial dos resultados, além de ser o mais adequado para determinar a atividade antifúngica de produtos naturais extraídos de plantas, por apresentar maior sensibilidade e reprodutibilidade (Scorzoni et al., 2007; Lass-Flörl et al., 2010; Treméa, 2015). Clinicamente, este método é importante, pois possibilita traçar o perfil de suscetibilidade dos isolados aos fármacos convencionais, determinando se são sensíveis, dose-dependentes ou resistentes, interferindo diretamente na decisão terapêutica (CLSI 2008; 2012), além de servir como triagem de atividade antimicrobiana de produtos naturais, servindo de partida para outros testes de atividade antimicrobiana (Scorzoni et al., 2007, Negri et al., 2014).

Não existe um consenso sobre o nível aceitável que represente a atividade antimicrobiana significativa para materiais oriundos de plantas (Mesa-Arango et al., 2009). Entretanto, a atividade *in vitro* de fitoquímicos pode ser considerada significativa se os valores de CIM estiverem abaixo de 100 µg/mL para extrato bruto



e moderados quando os valores de CIM variam de 100 a 625 µg/mL (Zida et al., 2016). O EMB de *T. acutifolius* apresentou CIM que variaram de 16 a 64 µl/mL, apresentando atividade significativa de acordo com o critério acima.

A análise de variância ANOVA demonstrou, com intervalo de confiança de 95%, que não existe diferença significativa entre a média das CIM do FLC e do EMB ( $p=0,30628$ ), sugerindo que o EMB apresenta semelhante atividade anti-*Candida* quando comparado ao FLC. Embora não havendo diferença significativa entre um tratamento e outro, dados observados individualmente apresentaram resultados promissores, onde o EMB apresentou CIM menores do que aquelas apresentadas pelo FLC para quatro isolados (Ca01, CgRL12m, CkRL52 e Ct94P).

Propriedades antifúngicas já foram atribuídas a outras plantas, relacionando tal atividade a alguns constituintes oriundos do metabolismo secundário do vegetal.

Rutina e quercetina são compostos polifenólicos, representantes da classe dos flavonoides, sendo estes encontrados principalmente em alimentos e bebidas, como frutas, vegetais, cereais, chá, café e vinho tinto (Seleem et al., 2016). Alguns estudos relatam os efeitos protetores dos flavonoides, incluindo atividades antimicrobianas e antifúngicas (Seleem et al., 2016), onde quercetina, isolada a partir de própolis, inibiu o crescimento de *C. albicans*, exercendo atividade antifúngica em casos de estomatite (Herrera et al., 2010). Catequinas encontradas no chá-preto, também polifenólicos derivados de núcleo flavonoídico, inibiram o crescimento de *C. albicans*, com valor de CIM de 6,25 µg/mL como resultado do dano da parede celular (Sitheeque et al., 2009).

O ácido gálico, composto fenólico simples, quando isolado de *Paeonia rockii* reduziu o número de hifas e tubos germinativos, com MIC de 30 µg/mL, em isolados de *C. albicans*, em um estudo realizado por microdiluição e análise morfológica das espécies (Picerno et al., 2011). Li e colaboradores (2017) demonstraram ação antifúngica de ácido gálico sobre *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, com concentração inibitória mínima de 12,5, 50 e 100 µg/mL, respectivamente.

Entretanto, a ação antimicrobiana de extratos vegetais brutos pode muitas vezes ser mais efetiva contra patógenos devido ao sinergismo entre seus constituintes, uma vez que os componentes bioativos minoritários podem contribuir para essa propriedade (Simonetti et al., 2016).

A associação entre agentes antifúngicos vem sendo descrita e algumas combinações apresentam efeitos sinérgicos sendo eficazes para inibir leveduras

resistentes (Alves et al., 2012). Recentemente, a terapia combinada entre medicamentos e extratos vegetais adquiriu atenção dos pesquisadores como um substituto promissor para a terapêutica antifúngica (Anand e Rai, 2017).

Apesar do ensaio de *checkerboard* demonstrar ação sinérgica somente para quatro isolados (Cg09, CgRL12m, Ct57Ae Ct94P), os novos valores obtidos pelo FLC, após a combinação deste com o EMB, diminuiram para todos os isolados, quando em comparação com os efeitos de fluconazol sozinho, chegando até mesmo a reverter o perfil de resistência para três isolados (Ca02, Ct57A e Ct94P), demonstrando assim a eficiência desta interação. A combinação entre as substâncias apresentou interação 'indiferente' para os demais seis isolados (ATCC18804, Ca01, CkRL102, CkRL52, CpRL38 e CpRL13m), sugerindo semelhantes mecanismos de ação entre ambas as substâncias, onde um mecanismo possivelmente dificultou o efeito do outro (Machado et al., 2016).

A interação ocorre quando os dois compostos são capazes de atingir as células microbianas em dois ou mais alvos distintos (Pfaller et al., 2014). Segundo Johnson e colaboradores (2014) existem vários mecanismos para uma interação antifúngica sinérgica entre duas substâncias: (i) Inibição em diferentes estágios da mesma via bioquímica, onde, por exemplo, ambos os compostos inibem a biossíntese do ergosterol, prejudicando a função das membranas celular em fungos; (ii) uma das substâncias age de maneira a fragilizar a membrana ou parede celular, facilitando a permeação da segunda substância que poderá agir sobre a síntese de DNA, por exemplo; (iii) uma substância interage sobre a membrana celular não permitindo que a outra seja expulsa da célula pelos mecanismos de defesa do microrganismos, possibilitando que a segunda substância permaneça no local de sua ação dentro da célula; (iv) ação simultânea em diferentes alvos da célula fúngica, como na parede e na membrana celular; e, (v) ação inicial mais potente da primeira substância, agindo como agente fungicida e reduzindo a carga fúngica, permitindo que a segunda substância aja sobre um número mais reduzido de células.

A análise de variância ANOVA, com intervalo de confiança de 95% ( $p=0,05$ ), mostrou que houve diferença significativa entre a média das CIM obtidos somente pelo FLC e aqueles valores obtidos após este ser combinado com o EMB ( $p=0,02744$ ), mostrando diferença entre os tratamentos e sugerindo que o EMB confere melhor eficácia anti-*Candida* ao FLC, uma vez que todas as CIM do FLC diminuiram

após a combinação entre as substâncias.

De modo geral, flavonoides presentes em extratos vegetais já apresentaram efeitos sinérgicos com fluconazol, uma vez que afetaram a permeabilidade da membrana celular em espécies de *Candida* (Liu et al., 2014). A interação entre flavonoides e fluconazol foi observada contra cepas de *C. tropicalis* resistentes a este fármaco, promovendo dano ao DNA e apoptose (Silva et al., 2014). Assim como também foi observada a interação entre fluconazol e uma fração contendo catequina e flavonoides, identificados no extrato de *Acca sellowiana*, contra *C. glabrata*, onde houve a inversão da resistência desta cepa, sugerindo que o efeito sinérgico ocorreu devido às substâncias afetarem diferentes alvos (Machado et al., 2016).

Este efeito sinérgico pode apresentar como vantagem a otimização da terapia, reduzindo a dose requerida para ambas as substâncias expressarem a atividade fungistática ou fungicida, e, conseqüentemente, amenizando os efeitos colaterais, como a hepatotoxicidade apresentada pelo fluconazol (Sanati et al., 1997; Cuenca-Estrella, 2004).

Os fungos, assim como os animais e seres humanos, são organismos eucariotos, apresentando muitas similaridades bioquímicas, fisiológicas e com extensa homologia entre os genes e proteínas, limitando o arsenal terapêutico antifúngico e dificultando o desenvolvimento de fármacos de baixa toxicidade (Areal, 2015). Este fato impõe um desafio à indústria farmacêutica no que diz respeito a pesquisas por novos compostos alternativos, mais seguros e eficientes, com atividade antifúngica e baixa toxicidade (Dhanasekaran et al., 2008; Marin et al., 2014).

O teste para avaliação de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro ensaio para avaliação do comportamento de um fármaco em células de mamíferos, sendo que essa verificação da toxicidade é antecessora aos testes *in vivo* (Treméa, 2015).

Neste trabalho optou-se por realizar ensaios para avaliação da viabilidade celular sobre queratinócitos humanos (linhagem HaCaT), ensaio HET-CAM para avaliar o grau de irritação de mucosas através do aparecimento de alterações vasculares; e, avaliação histopatológica a fim de verificar possíveis danos teciduais causados pela utilização do extrato, uma vez que este se mostrou eficaz como agente antifúngico.

Em relação às avaliações toxicológicas do EMB de *T. acutifolius*, das nove concentrações avaliadas, três (2, 8 e 16 µg/mL) apresentaram viabilidade celular

superior a 70% sobre os queratinócitos humanos (HaCaT), caracterizando estas concentrações como não citotóxicas. Ainda, as concentrações de 1, 4 32 e 64 µg/mL apresentaram viabilidade celular superior a 60%, sugerindo uma citotoxicidade fraca. Um estudo conduzido por Silva (2014) demonstrou que concentrações acima de 250 µl/mL apresentaram característica citotóxica sobre fibroblastos (V79) para o extrato aquoso de *T. acutifolius*. A avaliação de dano tecidual através de ensaio histopatológico não apresentou anormalidades, assim como o ensaio de HET-CAM não apresentou grau de irritação para todas as concentrações testadas do EMB de *T. acutifolius*. Tais resultados eram esperados uma vez que a planta já é amplamente utilizada na medicina popular, com comprovada propriedade protetiva em mucosa intestinal e redução de área hemorrágica (Silva, 2014). O baixo perfil toxicológico pode ser explicado devido à presença de flavonoides, sendo estes considerados compostos altamente bioativos e de baixa toxicidade, tornando-se bons candidatos terapêuticos (Prasain e Barnes, 2014).

## 7 CONCLUSÃO

Diante aos resultados obtidos, podemos concluir que o extrato metanólico bruto obtido a partir das folhas de *Tripodanthus acutifolius* apresenta potencial propriedade antifúngica contra isolados de *Candida* spp., uma vez que apresentou valores de concentração inibitória mínima inferiores a 100 µg/mL, sugerindo atividade significativa. Além disso, apresentou boa eficiência quando em combinação com o fármaco fluconazol, diminuindo as concentrações requeridas para este, principalmente frente aos isolados de *C. glabrata* e *C. tropicalis*, cuja interação mostrou-se sinérgica. Assim, a combinação entre o fármaco sintético e o extrato vegetal se mostra como uma estratégia de combate muito interessante frente às infecções ocasionadas por estas espécies.

Corroborando estes resultados, todas as concentrações testadas não demonstraram a ocorrência de lesões teciduais frente às células de mamíferos e perfil não irritante às mucosas. Ainda em relação ao perfil toxicológico, apesar de apenas três concentrações apresentarem perfil não citotóxico (2, 8 e 16 µg/mL), com viabilidade celular superior a 70%, as concentrações de 1, 4 32 e 64 µg/mL apresentaram viabilidade celular superior a 60%, sugerindo uma citotoxicidade fraca. Salienta-se que as concentrações de 16 a 64 µg/mL são também aquelas com ação anti-*Candida*.

O bom perfil antifúngico, aliado a uma baixa toxicidade, torna este extrato vegetal potencial candidato ao desenvolvimento de um novo terapêutico antifúngico, entretanto mais ensaios são necessários a fim de identificar e caracterizar os compostos majoritários presentes no extrato, avaliando se estes são os responsáveis pela propriedade anti-*Candida* ou se a eficácia deste extrato vegetal se deve a ação sinérgica entre seus constituintes. Além disso, deve-se realizar mais estudos para avaliar seu perfil toxicológico.

## 8 REFERÊNCIAS

Alencar LP. 2015. Atividade de *Moringa oleifera* in vitro contra fungos associados à carcinicultura de *Macrobrachium amazonicum* e envolvimento de bombas de efluxo no fenômeno de resistência a derivados azólicos em *Candida* spp. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza.

Alves IL, Bandeira LA, Mario DAN, Denardi LB, Neves LV, Santurio JM, Alves SH. 2012. Effects of antifungal agents alone and in combination against *Candida glabrata* strains susceptible or resistant to fluconazole. *Mycopathologia*.174: 215–221.

Anand J, Rai N. 2017. Anticandidal synergistic activity of green tea catechins, antimycotics and copper sulphate as a mean of combinational drug therapy against candidiasis. *Journal de Mycologie Médicale*. 27: 33-45.

Areal NAS. 2015. Atualização do manejo da candidíase vulvovaginal (CVV) e da candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR) visando à melhora da assistência a mulheres e gestantes. Monografia de Especialização (Programa de Pós- Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

Arendrup MC. 2014. Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. *Clinical Microbiology and Infection*. 20(6): 42-48.

Arif T, Bhosale JD, Kumar N, Mandal TK, Bendre RS, Lavekar GS, Dabur R. 2009. Natural products - antifungal agents derived from plants. *Journal of Asian Natural Products Research*. 11(7): 621-638.

Brandão IC. 2015. História natural de *Tripodanthus acutifolius* (Ruiz & Pav.) Tiegh (Loranthaceae) e interação com a comunidade vegetal dos campos rupestres ferruginosos. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo de Vida Silvestre). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

Brasil. 2013. Ministério da agricultura. Instrução Normativa nº 3/2000. Aprova Regulamento Técnico de Métodos de Insensibilização para Abate Humanitário de Animais de Açougue.

Chaudhari SP, Bangar JV, Akuskar GK, Ratnaparkhi MP. 2014. Development and validation of UV spectrophotometric method for simultaneous estimation of rutin and quercetin in niosome formulation. *Der Pharmacia Lettre*. 6(3): 271-276.

Chen S, Slavin M, Nguyen Q, Marriott D, Playford EG, Ellis D, Sorrell T. 2006. Active surveillance for candidemia, Australia. *Emerging Infectious Diseases*. 12(10): 1508-1516.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard -Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Fourth Informational Supplement. CLSI document M27-S4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Coelho RP, Feksa DL, Oliveira PM, Güllich AAC, Pilar BC, Piccoli JCE, Manfredini, V. 2018. Protective effect of the hydroalcoholic extract of *Tripodanthus acutifolius* in hypercholesterolemic Wistar rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 97: 300–309.

Colombo AL, Guimarães T. 2003. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 36(5): 599-607.

Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, Matta DA, Warnock D, Morgan J. 2006. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *Journal of Clinical Microbiology*. 44(8): 2816–2823.

Cooper Jr CR. 2011. Yeasts pathogenic for humans and animals. In: Kurtzmann CP, Fell JW, Boekhout T. *The yeasts: a taxonomic study*. 5th Ed: 9-19.

Correia AF, Silveira D, Fonseca-Bazzo YM, Magalhães PO, Fagg CW, Silva EC, Gomes SM, Gandolfi L, Pratesi R, Nóbrega YKM. 2016. Activity of crude extracts from brazilian cerrado plants against clinically relevant *Candida* species. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 16:203.

Crawshaw WM, Macdonald NR, Duncan G. 2005. Outbreak of *Candida rugosa* mastitis in a dairy herd after intramammary antibiotic treatment. *Veterinary Record*. 156: 812-813.

Cuenca-Estrella M. 2004. Combinations of antifungal agents in therapy—what value are they? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 54: 854–869.

da Costa VG, Quesada RMB, Abe ATS, Furlaneto-Maia L, Furlaneto MC. 2014. Nosocomial Bloodstream *Candida* Infections in a Tertiary Care Hospital in South Brazil: A 4-Year Survey. *Mycopathologia*. 178:243–250.

Daud A, Gallo A, Riera AS. 2005. Antimicrobial properties of *Phrygilanthus acutifolius*. *Journal of Ethnopharmacology* 99: 193–197.

Daud A, Habib N, Riera AS. 2006. Anti-inflammatory, anti-nociceptive and antipyretic effects of extracts of *Phrygilanthus acutifolius* flowers. *Journal of Ethnopharmacology* 108(2): 198–203.

Deorukhkar SC, Saini S. 2016. Why *Candida* species have emerged as important nosocomial pathogens? *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*. 5(1): 533-545.

Dettke GA, Waechter JL. 2014. Estudo taxonômico das ervas-de-passarinho da Região sul do Brasil: I. Loranthaceae e Santalaceae. *Rodriguésia* 65(4): 939-953.

- Dhanasekaran D, Thajuddin N, Panneerselvam A. 2008. An antifungal compound: 4'phenyl-1-naphthyl-phenyl acetamide from *Streptomyces* sp. DPTB16. *Medicine and Biology*. 15(1): 7-12.
- Diezmann S, Cox CJ, Schönian G, Vilgalys RJ, Mitchell TG. 2004. Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(12): 5624–5635
- Dühring S, Germerodt S, Skerka C, Zipfel PF, Dandekar T, Schuster S. 2015. Host-pathogen interactions between the human innate immune system and *Candida albicans* - understanding and modeling defense and evasion strategies. *Frontiers in Microbiology*. 6.
- Dworecka-Kaszak B, Krutkiewicz A, Szopa D, Kleczkowski M, Biegńska M. 2012. High prevalence of *Candida* yeast in milk samples from cows suffering from mastitis in Poland. *Scientific World Journal*. 2012:1-5.
- Espinel-Ingroff A. 2008. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. *Revista Iberoamericana de Micología*. 25(2): 101-106.
- Fidel Jr PL, Vazquez JA, Sobel JD. 1999. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(1): 80–96.
- Fleischmann J, Broeckling CD, Lyons S. 2017. *Candida krusei* form mycelia along agar surfaces towards each other and other *Candida* species. *BMC Microbiology*. 17:60.
- Gaitén YIG, Martínez MM, Henriques AT, Alonso GB. 2010. Análisis de flavonoides en una fracción butanólica obtenida de *Phyllanthus orbicularis* HBK. *Revista Cubana de Farmacia*. 44(3): 367-373.
- Giolo MP, Svidzinski TIE. 2010. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 46(3): 225-234.
- Giordani C, Santin R, Cleff MB. 2015. Levantamento de extratos vegetais com ação anti-*Candida* no período de 2005-2013. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 17(1): 175-185.
- Grayer RJ, Harborne JB. 1994. A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. *Phytochemistry*. 37(1): 19-42.
- Grüner JM, Souza TK, Benitez LB, Silva CM. 2012. Análise do perfil fitoquímico de *Tripodanthus acutifolius* (Ruiz & Pavón) Tieghem, Loranthaceae. *Revista Jovens Pesquisadores*. 1(1): 9-17.
- Gulati M, Nobile CJ. 2016. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and Infection*. 18(5): 310–321.



Gupta PD, Birdi TJ. 2017. Development of botanicals to combat antibiotic resistance. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*. 1-10.

Harborne JB, Williams CA. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55(6): 481-504.

Herrera CL, Alvear M, Barrientos L, Montenegro G, Salazar LA. 2010. The antifungal effect of six commercial extracts of Chilean propolis on *Candida* spp. *Ciência e Investigação Agrária*. 37(1): 75-84.

Hirasawa M, Takada K. 2004. Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53(2): 225–229.

Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVMA). 2010. The Hen's Egg Test–Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method. Research Triangle Park: National Toxicology Program.

Intersimone NH, Thoene AD, Riera AS. 2005. Efecto diurético de extractos acuosos y alcohólicos de flores de *Phrygilanthus acutifolius* (corpo) en ratas. *Revista Cubana Plantas Medicinales*. 10: 3-4.

ISO 10993-5:2009. Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland.

Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH. 2004. Combination antifungal therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48(3): 693-715.

Kathiravan MK, Salake AB, Chothe AS, Dudhe PB, Watode RP, Mukta MS, Gadhwe S. 2012. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 20: 5678–5698.

Knöppel A, Näsval J, Andersson DI. 2017. Evolution of antibiotic resistance without antibiotic exposure. *Antimicrob. Agents Chemother.*

Kuijt J. 1969. The biology of parasitic flowering plants. University of California Press, Berkeley. 246p.

Lass-Flörl C, Perkhofer S, Mayr A. 2009. *In vitro* susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods. *Mycoses - Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases*. 53: 1–11.

Leal L, Bujokas WM, Biondi D. 2006. Análise da infestação de erva-de-passarinho na arborização de ruas de Curitiba, PR. *Floresta*. 36(3): 323-330.

Li ZJ, Liu M, Dawuti G, Dou Q, Ma Y, Liu HG, Aibai A. 2017. Antifungal activity of gallic acid in vitro and *in vivo*. *Phytother. Res*. 31: 1039–1045.

Liu S, Hou Y, Chen X, Gao Y, Li H, Sun S. 2014. Combination of fluconazole with non-antifungal agents: a promising approach to cope with resistant *Candida albicans* infections and insight into new antifungal agent discovery. *International Journal of Antimicrobial Agents*.

Loguercio AP, Battistin A, Vargas AC, Henzel A, Witts NM. 2005. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). *Ciência Rural*. 35(2): 371-376.

López-García J, Lehocký M, Humpolíček P, Sába P. 2014. HaCaT keratinocytes response on antimicrobial atelocollagen substrates: extent of cytotoxicity, cell viability and proliferation. *Journal of Functional Biomaterials*. 5: 43-57.

Luepke NP. 1985. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food and Chemical Toxicology* 23: 287-291.

Machado GRM, Pippi B, Dalla Lana DF, Amaral APS, Teixeira ML, Souza KCB, Fuentefria AM. 2016. Reversal of fluconazole resistance induced by a synergistic effect with *Acca sellowiana* in *Candida glabrata* strains. *Pharmaceutical Biology*. 54(11): 2410-2419.

Marin R. 2014. *Solidago chilensis* Meyer: desenvolvimento de métodos analíticos, extratos secos qualificados, avaliação farmacológica in vivo e produção de comprimidos. Tese (Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

Marra AR, Camargo LF, Pignatari AC, Sukiennik T, Behar PR, Medeiros EA, Ribeiro J, Girão E, Correa L, Guerra C, Brites C, Pereira CA, Carneiro I, Reis M, de Souza MA, Tranchesi R, Barata CU, Edmond MB. 2011. Nosocomial bloodstream infections in brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Journal of Clinical Microbiology*. 49(5):1866–1871.

Martins N, Barros L, Henriques M, Silva S, Ferreira ICFR. 2015. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. *Industrial Crops and Products* 74: 648–670.

Maurya IK, Thota CK, Sharma J, Tupe SG, Chaudhary P, Singh MK, Thakur IS, Deshpande M, Prasad R, Chauhan VS. 2013. Mechanism of action of novel synthetic dodecapeptides against *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830: 5193–5203.

Mesa-Arango AC, Montiel-Ramos J, Zapata B, Durán C, Betancur-Galvis L, Stashenko E. 2009. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 104(6): 878-884.

Miceli MH, Díaz JA, Lee SA. 2011. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis*. 11(2): 142–51.

Moraes RC, Dalla Lana AJ, Kaiser S, Carvalho AR, Oliveira LFS, Fuentefria AM, Ortega GG. 2015. Antifungal activity of *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. against resistant non-*albicans Candida* isolates. *Industrial Crops and Products* 69: 7–14.

Müller FMC, Staudigel A, Salvenmoser S, Tredup A, Miltenberger R, Herrmann JV. 2007. Cross-resistance to medical and agricultural azole drugs in yeasts from the oropharynx of human Immunodeficiency virus patients and from environmental bavarian vine grapes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51(8): 3014–3016.

Muñoz V, Sauvain M, Bourdy G, Arrázola S, Callapa J, Ruiz G, Choque J, Deharo E. 2000. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part III. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Alteños Indians. *Journal of Ethnopharmacology*. 71: 123–131.

Negri M, Salci TP, Shinobu-Mesquita CS, Capoci IRG, Svidzinski TIE, Kioshima ES. 2014. Early state research on antifungal natural products. *Molecules*. 19: 2925-2956.

Neilson AP, Green RJ, Wood KV, Ferruzzi MG. 2006. High-throughput analysis of catechins and theaflavins by high performance liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Chromatography A*. 1132: 132–140.

Nickrent DL, Malécot V, Vidal-Russell R, Der JP. 2010. A revised classification of Santalales. *Taxon* 59(2): 538–558.

Nickrent DL. 2017. Parasitic plant genera and species. Tabela atualizada em 23 de maio de 2017. Disponível em <http://parasiticplants.siu.edu/ParPlantNumbers.pdf>. Acesso em 28 de novembro de 2017.

O'Neill J. 2014. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. Review on Antimicrobial Resistance. Disponível em <https://amr-review.org/Publications.html>. Acesso em 15 de janeiro de 2018.

O'Neill J. 2015. Antimicrobial in agriculture and the environment: reducing unnecessary use and waste. Review on Antimicrobial Resistance. Disponível em <https://amr-review.org/Publications.html>. Acesso em 15 de janeiro de 2018.

O'Neill J. 2016. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Review on Antimicrobial Resistance. Disponível em <https://amr-review.org/Publications.html>. Acesso em 15 de janeiro de 2018.

Patterson TF. 2005 Advances and challenges in management of invasive mycoses. *Lancet*. 366(9490): 1013–1025.

Pawar NP, Salunkhe VR. 2013. Development and validation of UV spectrophotometric method for simultaneous estimation of rutin and gallic acid in hydroalcoholic extract of *Triphala churna*. *International Journal of PharmTech Research*. 5(2): 724-729.

Pfaller MA, Diekema DJ. 2010. Epidemiology of invasive mycoses in north America. *Critical Reviews in Microbiology*. 36(1): 1–53.

Pfaller MA, Diekema DJ. 2012. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of clinical and laboratory standards institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. *Journal of Clinical Microbiology*. 50(9): 2846–2856.

Pfaller MA, Andes DR, Diekema DJ, Horn DL, Reboli AC, Rotstein C, Franks B, Azie NE. 2014. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-albicans species of *Candida* in 2496 patients: data from the prospective antifungal therapy (PATH) registry 2004–2008. *PlosOne* 9(7): e101510.

Picerno P, Mencherini T, Sansone F, Del Gaudio P, Granata I, Porta A, Aquino RP. 2011. Screening of a polar extract of *Paeonia rockii*: composition and antioxidant and antifungal activities. *Journal of Ethnopharmacology*. 138: 705– 712.

Pippi B, Dala Lana AJ, Moraes RC, Güez CM, Machado M, Oliveira LFS, von Poser GL, Fuentefria AM. 2015. *In vitro* evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp. *Journal of Applied Microbiology*. 118: 839--850.

Prasain JK, Barnes S. 2014. Uptake and metabolism of dietary proanthocyanidins. In: Watson RR, Preedy VR, Zibadi S. *Polyphenols in human health and disease*. Chapter 41: 553-560.

Pretsch E, Clerc T, Seibl J, Simon W. 1989. Tables of spectral data for structure determination of organic compounds. *Laboratory Chemical Practice*. Second Edition.

Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot, JL. 2005. *Candida* Biofilms: an update. *Eukaryotic Cell*. 4(4):633–638.

Reichart PA, Samaranayake LP, Samaranayake YH, Grote M, Pow E, Cheung B. 2002. High oral prevalence of *Candida krusei* in leprosy patients in northern Thailand. *Journal of Clinical Microbiology*. 40(12): 4479–4485.

Ribas e Ribas AD, Spolti P, Del Ponte EM, Donato KZ, Schrekker H, Fuentefria AM. 2016. Is the emergence of fungal resistance to medical triazoles related to their use in the agroecosystems? A mini review. *Brazilian Journal of Microbiology*. 47(4): 793–799.

Ricco RA, Lozano V, Lator V, Gurni AA, Wagner ML. 2008. Modificación en el perfil de polifenoles de *Tripodanthus acutifolius* (Ruiz et Pav.) Tiegh. (Loranthaceae) infectado por “Cochinilla” (Homoptera - Lecanidae). *Latin American Journal of Pharmacy*. 27(2): 258-62.

Rishton G. M. 2008. Natural Products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. *American Journal of Cardiology*. 101(10): S43-S49.

Rodrigues CF, Silva S, Henriques M. 2014. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 33: 673–688.

Rosato A, Vitali C, Gallo D, Balenzano L, Mallamaci R. 2008. The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. *Phytomedicine* 15: 635–638.

Rotta E, Oliveira YMM, Araújo AJ, Inoue MT. 2005. Reconhecimento prático de cinco espécies de erva-de-passarinho na arborização de Curitiba, PR. Documentos Embrapa.

Salari S, Bakhshi T, Sharififar F, Naseri A, Almani PGN. 2016. Evaluation of antifungal activity of standardized extract of *Salvia rhytidea* Benth. (Lamiaceae) against various *Candida* isolates. *Journal de Mycologie Médicale*.

Samaranayake YH, Samaranayake P. 1994. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *Journal of Medical Microbiology*. 41: 295-310.

Sanati H, Ramos CF, Bayer AS, Ghannoum MA. 1997. Combination Therapy with Amphotericin B and Fluconazole against Invasive Candidiasis in Neutropenic-Mouse and Infective-Endocarditis Rabbit Models. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41(6): 1345–1348.

Sanguinetti M, Posteraro B, Fiori B, Ranno S, Torelli R, Fadda G. 2005. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49(2): 668–679.

Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Giannini MJSM. 2013. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*. 62: 10–24.

Scalbert A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 30(12): 3875-3883.

Scorzoni L, Benaducci T, Almeida AMF, Silva DHS, Bolzani VS, Gianinni MJSM. 2007. The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp. and *Cryptococcus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38:391-397.

Seleem D, Pardi V, Murata RM. 2016. Review of flavonoids: a diverse group of natural compounds with anti-*Candida albicans* activity *in vitro*. *Archives of Oral Biology*.

Shokri H, Khosravi AR, Yalfani R. 2011. Antifungal efficacy of propolis against fluconazole-resistant *Candida glabrata* isolates obtained from women with recurrent vulvovaginal candidiasis. *Brief communications*. 158-159.

Sifuentes-Osornio J, Corzo-León DE, Ponce-de-León LA. 2012. Epidemiology of invasive fungal infections in Latin America. *Current Fungal Infection Reports*. 6:23-34.

Silva CM. 2014. Estudo químico e biológico de *Tripodanthus acutifolius* (Ruiz & Pav.) Tiegh., Loranthaceae. Tese (Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

Silva CR, Neto JBA, Campos RS, Figueiredo NS, Sampaio LS, Magalhães HIF, Cavalcanti BC, Gaspar DM, Andrade GM, Lima ISP, Viana GSB, Moraes MO, Lobo MDP, Grangeiro TB, Nobre Jr HV. 2014. Synergistic effect of the flavonoid catechin, quercetin, or epigallocatechin gallate with fluconazole induces apoptosis in *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 58(3): 1468–1478.

Silva F, Ferreira S, Duarte A, Mendonça DI, Domingues FC. 2011. Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine* 19: 42– 47.

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. 2012. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*. 36: 288–305.

Silverstein R, Webster FX, Kiemle DJ. 2007. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Rio de Janeiro: Sétima edição. LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A. 490 p.

Simonetti E, Ethur ME, Castro LC, Kauffmann C, Giacomini AC, Ledur A, Arossi K, Pachaco LA, Goettert MI, Faleiro D, Freitas EM. 2016. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 18(1): 9-18.

Sitheequ MAM, Panagoda GJ, Yau J, Amarakoon AMT, Udagama URN, Samaranyake LP. 2009. Antifungal activity of black tea polyphenols (catechins and theaflavins) against *Candida* species. *Chemotherapy* 55:189–196.

Soberón JR, Sgariglia MA, Sampietro DA, Quiroga EN, Vattuone MA. 2007. Antibacterial activity of plant extracts from northwestern Argentina. *Journal of Applied Microbiology*. 102(6): 1450–1461.

Soberón JR, Sgariglia MA, Sampietro DA, Quiroga EN, Vattuone MA. 2010a. Study of antiinflammatory activity of metabolites isolated from *Tripodanthus acutifolius*. *Molecular Medicinal Chemistry*. 21: 88-90.

Soberón JR, Sgariglia MA, Sampietro DA, Quiroga EN, Vattuone MA. 2010b. Free radical scavenging activities and inhibition of inflammatory enzymes of phenolics isolated from *Tripodanthus acutifolius*. *Journal of Ethnopharmacology* 130(2): 329–333.

Soberón JR, Sgariglia MA, Sampietro DA, Quiroga EN, Sierra MG, Vattuone MA. 2010c. Purification and identification of antibacterial phenolics from *Tripodanthus acutifolius* leaves. *Journal of Applied Microbiology* 108(5): 1757–1768.

Soberón JR, Sgariglia MA, Sampietro DA, Vattuone MA. 2011. Actividad antifúngica combinada de tripodantósido y anfotericina B sobre levaduras del genero *Candida*. Congreso. XXVIII Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán.

Souza TK, Silva CM, Benitez LB, von Poser GL, Zuanazzi JAS. 2014. Atividade antibacteriana do extrato aquoso de *Tripodanthus acutifolius* frente à *Staphylococcus aureus*. Revista Jovens Pesquisadores. 4(1): 6-18.

Staib P, Morschhäuser J. 2006. Chlamyospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* – an enigmatic developmental programme. Journal Compilation. 50: 1–12.

Taveira M, Silva LR, Vale-Silva LA, Pinto E, Valentão P, Ferreres F, Pinho PG, Andrade PB. 2010. *Lycopersicon esculentum* seeds: an industrial byproduct as an antimicrobial agent. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 58: 9529–9536.

Tereschuk ML, Riera MVQ, Castro GR, Abdala LR. 1997. Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. Journal of Ethnopharmacology. 56: 227–232.

Thompson DS, Carlisle PL, Kadosh D. 2011. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. Eucaryotic Cell. 10(9): 1173–1182

Tortorano AM, Dho G, Prigitano A, Breda G, Grancini A, Emmi V, Cavanna C, Marino G, Morero S, Ossi C, Delvecchio G, Passera M, Cusumano V, David A, Bonaccorso G, Corona A, Favaro M, Vismara C, Garau MG, Falchi S, Tejada MR. 2011. Invasive fungal infections in the intensive care unit: a multicentre, prospective, observational study in Italy (2006–2008). Mycoses - Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases. 55: 73–79.

Treméa CR. 2015. Atividade dos óleos essenciais de *Litsea cubeba* e *Cymbopogon martini* sobre isolados do complexo *Cryptococcus neoformans*. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biologia das Relações Parasito-Hospedeiro). Universidade Federal de Goiás. Goiânia.

Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. 2008. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. Clinical Microbiology Reviews. 21(4): 606–625.

Uppuluri P, Khan A, Edwards JE. 2017. Current Trends in Candidiasis. In: Prasad R. *Candida albicans: Cellular and molecular biology*. Chapter 2: 5-23.

van Asbeck EC, Clemons KV, Stevens, DA. 2009. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. Critical Reviews in Microbiology. 35(4): 283–309.

Venter H, Henningsen ML, Begg SL. Antimicrobial resistance in healthcare, agriculture and the environment: the biochemistry behind the headlines. Essays in Biochemistry. 61: 1–10.

Wagner ML, Ricco RA, Ranea FG, Gurni AA. 2009. Flavonoides de especies argentinas del género *Tripodanthus* (Eichl.) Tiegh. (Loranthaceae). Dominguezia. 25(1): 21-27.

Wanderley L, Bianchin A, Teo CRPA, Fuentefria AM. 2013. Occurrence and pathogenicity of *Candida* spp. in unpasteurized cheese. Revista Brasileira de Biociências. 11(2): 144-147.

Yan K, Zhang Y, Chi Z. 2010. Distribution and diversity of *Candida tropicalis* strains in different marine environments. Journal of Ocean University of China (Oceanic and Coastal Sea Research). 9: 139-144.

Zida A, Bamba S, Yacouba A, Ouedraogo-Traore R, Guiguemdé RT. 2016. Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review. Journal de Mycologie Médicale.



## 9 ANEXOS

### Anexo 1. Cópia da autorização para coleta do material vegetal.



#### AUTORIZAÇÃO PARA MANEJO DA ARBORIZAÇÃO URBANA Nº 282/2010/SEMMAS

A Secretaria Municipal de Meio Ambiente e Saneamento, criada pela Lei complementar Nº 376 de 15/02/08, e conforme Lei Ambiental Municipal Nº 3.705 de 17/05/01, no uso das atribuições que lhe confere a Resolução CONAMA Nº 237, de 19/12/97, alterando a Lei Nº 6.938, de 31/08/81, que dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, regulamentada pelo Decreto Nº 99.774, de 06/06/90 e com base na Resolução CONSEMA Nº 102, de 24/05/05, definindo o licenciamento ambiental de impacto local, conforme convenio firmado entre o Município e a Fundação Estadual de Proteção Ambiental - FEPAM de 03/09/07 definindo a ampliação nas atribuições do licenciamento ambiental e de acordo com análise prévia, conforme solicitação e após vistoria realizada, autoriza **Chana Medeiros da Silva** o seguinte:

Tipo de manejo: coleta

Quantidade: ilimitado

Espécie: erva de passarinho (*Tripodanthus* sp.)

Localização: área

Telefone: 3717-7399 e 9989-7067

#### 4. ENCAMINHAMENTO:

PARECER COM VISTAS A(O):      (x) AUTORIZAÇÃO PARA COLETA      ( ) INDEFERIMENTO

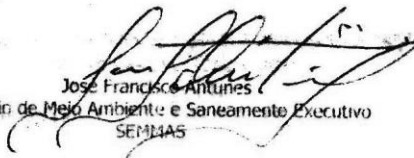
#### VISTO OS SEGUINTE MOTIVOS:

- Fins de pesquisa em fitoquímicos e farmacológicos

#### CONDIÇÕES E RESTRICÇÕES:

- Fica autorizada a coleta de *Tripodanthus* sp. (erva-de-passarinho) na área urbana de Santa Cruz do Sul.
- Na remoção do material coletado não poderá ser danificada a vegetação próxima. Porém, fica autorizada a remoção das porções de árvores desvitalizadas, caso não seja possível realizar a coleta de outra forma - neste caso, os resíduos deverão ser recolhidos e encaminhados pelo coletor.

Santa Cruz do Sul, 04 de outubro de 2010.

  
José Francisco Antunes  
Secretário de Meio Ambiente e Saneamento Executivo  
SEMMAS

**Anexo 2.** Exsicata de *Tripodanthus acutifolius* depositada no Instituto de Ciências Naturais (ICN) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).



Herb. Depto. Bot. da UFRGS - Porto Alegre

**Nome:** *Tripodanthus acutifolius* (Ruiz e Pavón) Thieghem

**Fam.:** Loranthaceae **ICN:** 167796

**Nome pop.:** Erva-de-passarinho

**Col.:** C.M. da Silva

**Det.:** C.M. da Silva

**Loc. Brasil:** RS, Santa Cruz do Sul, rua Gaspar Silveira Martins esquina Coronel Oscar Jost

**Data:** 25.01.2011

**Alt.:**

**Habitat:**

**Biologia:** Hemiparasita