

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS VEGETAIS DE *Senna spectabilis* e *Rosmarinus officinalis* FRENTE A CEPA PADRÃO DE *Candida albicans* ATCC 10231

STUDY OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF VEGETABLE EXTRACTS OF *Senna spectabilis* and *Rosmarinus officinalis* PATTERN CEPA OF *Candida albicans* ATCC 10231

Lays Fernandes dos Santos¹, Monique Érika Galvão¹, Thais Mari Maeda¹, Gustavo Meireles Costa², Vinicius Pereira Arantes^{3*}

¹Acadêmicas do programa de Iniciação Científica da Universidade Paranaense – Unipar.

²Docente do curso de Farmácia da Unipar – Campus Paranavaí - PR.

³Docente do curso de Farmácia e Coordenador do projeto de iniciação científica PIC/PIBIC – Unipar - Campus Paranavaí - PR.

*Endereço para correspondência: Avenida Senador Souza Naves, 613 - Centro-Cruzeiro do Sul - PR, CEP: 87.650.000.
Email: vinicius@prof.unipar.br

RESUMO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera as plantas medicinais como importante instrumento de assistência farmacêutica, estima-se que 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos a partir de fontes naturais. Objetivou-se avaliar a atividade antifúngica dos extratos hidroalcoólicos de *Rosmarinus officinalis* e *Senna spectabilis* frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Avaliou-se a atividade antifúngica dos extratos vegetais empregando diferentes metodologias. Para avaliar atividade antifúngica dos extratos vegetais foi empregada a metodologia do MABA – Microplate Alamar Blue Assay, os extratos foram testados nas concentrações 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125 e 62,5 µg/mL. A determinação da concentração mínima inibitória (CIM) correspondeu à última diluição capaz de inibir o crescimento; para controle da droga empregou-se Nistatina – suspensão comercial 100.000 UI/mL. Avaliou-se a cinética de crescimento das células da *Candida albicans* ATCC 10231, empregando tubos de vidro estéreis com 0,2 mL de suspensão fúngica, 1,8 mL de Caldo Sabouraud e 2 mL de extrato nas mesmas concentrações que a CIM, os tubos foram incubados a 37 °C e nos tempos de: zero, 30, 60, 90 e 120 min; semeou-se 10 µL da contagem correspondente a cada tempo em Ágar Sabouraud-Dextrose (incubadas à 37 °C) para contagem em UFC/mL, os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados obtidos apresentaram inibição do crescimento da cepa de *Candida albicans* em 500 µg/mL, empregando *Senna spectabilis* e 250 µg/mL para *Rosmarinus officinalis*. Para avaliação de inibição cinética foram apresentados resultados satisfatórios em diferentes concentrações dos extratos e tempos, as confirmações foram realizadas em Ágar Sabouraud Dextrose.

Palavras-Chave: *Senna spectabilis*; *Rosmarinus officinalis*; *Candida albicans*; antifúngica.

ABSTRACT

The World Health Organization (WHO) considers medicinal plants as an important instrument of pharmaceutical assistance, it is estimated that 40% of the currently available medicines were developed from natural sources. The objective was to evaluate the antifungal activity of hydroalcoholic extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Senna spectabilis* against *Candida albicans* ATCC 10231. The antifungal activity of the vegetal extracts was evaluated using different methodologies. To evaluate the antifungal activity of the plant extracts the methodology of the MABA - Microplate Alamar Blue Assay, was used. The extracts were tested in the concentrations 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125 and 62.5 µg/mL. The determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) corresponded to the last dilution capable of inhibiting growth. Nystatin - commercial suspension 100,000 IU/mL was used as drug control. Cell growth kinetics of *C. albicans* ATCC 10231 were evaluated using sterile glass tubes with 0.2 mL of fungal suspension, 1.8 mL of Sabouraud Broth and 2 mL of extract at the same concentrations as the MIC, incubated at 37 °C and at zero, 30, 60, 90 and 120 min, 10 µL of the corresponding counts were taken at each time in Sabouraud-Dextrose agar (incubated at 37 °C) for CFU/mL counts, the experiments were performed in triplicate. The obtained results showed inhibition of growth of the *C. albicans* strain at 500 µg/mL, using *S. spectabilis* and 250 µg/mL for *R. officinalis*. The kinetic inhibition evaluation were presented as satisfactory in different concentrations of extracts and times, confirmations were performed in Sabouraud Agar Dextrose.

Key Words: *Senna spectabilis*, *Rosmarinus officinalis*, *Candida albicans*, antifungal.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de produtos naturais com empregabilidade na atividade clínica pode criar novas estratégias de controle para doenças infecciosas. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 65% da população mundial utilizam produtos naturais em diferentes tratamentos, destacando os países em desenvolvimento, com grande diversidade étnica e cultural e com grande biodiversidade. O Brasil destaca-se no cenário mundial por apresentar a maior biodiversidade do planeta, associado ao imenso conhecimento popular para uso de plantas medicinais, oriundo da expressiva diversidade cultural e que desta forma permite a utilização para o tratamento de enfermidades antibacterianas, antifúngicas e antiparasitárias (1-4).

Acredita-se que 80% da população mundial já fez uso de plantas medicinais para alívios de desconfortos fisiológicos e, desses, aproximadamente 30% com indicações médicas. Os estudos revelam que 30 a 40% dos medicamentos utilizados pela população possuem como base algum precursor vegetal, sendo assim, as plantas representam uma ótima opção para descoberta de novos produtos antimicrobianos, com menor custo, menor toxicidade e maior acesso a população (5).

O uso de plantas medicinais no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto espécie humana, assim, esse conhecimento representa, muitas vezes, um recurso terapêutico para muitas comunidades e grupos étnicos e que não dispõem de acesso a outros tratamentos convencionais e disponíveis. Neste contexto, inclui-se *Senna spectabilis* e *Rosmarinus officinalis*.

Senna spectabilis (sin *Cassia spectabilis*) (DC) Irwin et Barn (Leguminosae), é uma planta decídua, heliófita, xerófita seletiva e nativa das Américas Central e do Sul, sendo encontrada principalmente nos cerrados e caatinga do Nordeste do Brasil. É uma árvore de crescimento rápido atingindo de 6 a 9 metros de altura e 30-40 cm de diâmetro, apresentando uma orla de densas folhas com dossel simétrico. As folhas são compostas e pinadas, com 10-20 pares de folíolos de 2-4 cm de comprimento, de formato oblongo e simetria alternada. Sua

madeira é considerada moderadamente pesada, mole e pouco compacta, com durabilidade média se protegida da umidade. De acordo com Viegas et al. (6), extratos vegetais de *S. spectabilis* apresentam atividade analgésica, antiinflamatória e inibitória de superóxido. Sangetha et al. (7) demonstraram a capacidade citotóxica de extratos metanólicos da espécie em células de *Candida albicans* e constataram que extratos aquosos brutos de *S. spectabilis* apresentaram efeito inibitório no crescimento de *Bacillus cereus*.

Rosmarinus officinalis L., conhecida popularmente como alecrim, é originária da Região Mediterrânea e cultivada em quase todos os países de clima temperado de Portugal a Austrália. A planta possui porte subarborescente lenhoso, ereto e pouco ramificado de até 1,5 m de altura. Folhas são lineares, coriáceas e muito aromáticas, medindo 1,5 a 4 cm de comprimento por 1 a 3 mm de espessura. A planta e os extratos de alecrim são utilizados na indústria agroalimentícia por suas propriedades antioxidantes e conservantes. Também é indicado para uso tópico local, como cicatrizante, antimicrobiana e estimulante do couro cabeludo (8).

Os fungos são seres eucarióticos com parede celular, constituídos por quitina, pode apresentar-se na forma leveduriforme e ou filamentosa, podem causar doenças superficiais, subcutâneas e ou sistêmicas. As infecções fúngicas possuem relevância dentre as doenças de saúde pública, por vezes aumentando os casos de internações e acometimentos nosocomiais, consequentemente as taxas de mortalidade e morbidade têm se elevado nos últimos anos. As doenças mais comuns são a candidíase e aspergilose, em associação as infecções pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e a ocorrência da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), muitas doenças obtiveram um grande avanço nos dados epidemiológicos (9).

Candida albicans é uma levedura que pode estar presente em boca, região urogenital e interdigitais. O gênero *Candida* sp. é constituído por mais de 200 espécies, são patógenos de humanos e animais, as principais espécies são: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata*. Segundo Darões (10), a principal espécie é *C. albicans*, por apresentar maior capacidade de causar enfermidades em

humanos; são unicelulares, eucarióticos, possuem morfologia ovóide, cilíndrica e alongada, aproximadamente 2 a 8 µm de largura e 3 a 14 µm de comprimento (11).

A patogênese da *Candida* sp. é facilitada por fatores inerentes a sua capacidade de aderência às células do hospedeiro, podendo acometer infecções em pele e mucosas, trato digestivo, vagina e cavidade oral (10,12). A candidíase bucal é uma das causas infecciosas mais comuns dentre os seres humanos, sendo descrita como oportunista, a ocorrência está relacionada com equilíbrio das funções imunes, decorrendo de forma associada em pacientes com doenças crônicas, síndrome da imunodeficiência humana (13)

O objetivo do trabalho foi estudar a atividade antifúngica e avaliação do efeito cinético de extratos vegetais de *Rosmarinus officinalis* e *Senna spectabilis* frente à cepa padrão de *Candida albicans* ATCC 10231.

METODOLOGIA

Material vegetal

Todo o material vegetal foi coletado em abril de 2017 no período da manhã. Folhas de *R. officinalis* e *S. spectabilis* foram coletadas no Horto Medicinal da Universidade Estadual de Maringá - PR. Posteriormente as folhas foram secas em estufa de ar circulante (Quimis®, modelo Q-31) em uma temperatura de 40 °C e moído em moinho de facas (Tecnal Marconi®, modelo TE 048), utilizou-se malha com diâmetro de 0,5 mm.

Preparo do extrato vegetal

A maceração foi realizada empregando folhas de *R. officinalis* e *S. spectabilis* em uma proporção de 90-10% (v/v) por 48h a uma temperatura ambiente 25 °C e protegido da luz. Os extratos foram filtrados e concentrados em rotaevaporador (modelo: IKA RV10 BASIC) em temperatura de 40 °C, obtendo um resíduo chamado de extrato hidroalcoólico, este resíduo foi retirado com acetato de etila deixando em temperatura ambiente e protegido de luz até a completa evaporação do solvente. Coletaram-se os extratos em frascos de vidros e armazenados em freezer a -10 °C.

Cepa Padrão

A cepa de *C. albicans* ATCC 10231 Newprov® empregada neste estudo foi

adquirida através da Universidade Paranaense-Unipar. As cepas foram reativadas em Caldo Sabouraud, repicadas em Ágar Sabouraud Dextrose 4% e disponibilizadas para uso.

Microdiluição em placa

O trabalho foi realizado em triplicata utilizando o método de microdiluição em microplaca contendo 96 poços, padronizado por Franzblau (14) e adaptações segundo o National Committee for Clinical Laboratory Standart (NCCLS) (15). Os extratos empregados neste estudo seguiram a concentração 90-10% (V/V) em todos os testes.

Para a realização da técnica de microdiluição pela metodologia do MABA (*Microplate Alamar Blue Assay*) foi utilizada placa estéril de 96 orifícios. Nas colunas 1 e 12 em linhas de A a H foram adicionados 200 µL de água destilada estéril, perfazendo a necessidade de evitar provável evaporação dos compostos a serem testados.

Os orifícios presentes nas linhas de A a D da coluna 11 receberam 200 µL de Caldo Mueller-Hinton, os orifícios correspondentes de E a H da coluna 11 receberam 100 µL de caldo Mueller-Hinton. Os orifícios correspondentes da linha A de colunas de 2 a 10 receberam 150 µL de meio caldo Mueller-Hinton e os de linha B a H referentes à coluna 2 a 10, receberam 100 µL de caldo Mueller-Hinton.

Foram então adicionados os extratos diluídos a serem testados. Todos os extratos foram diluídos para que estivessem na concentração inicial de 16.000 µg/mL. A linha A e B da microplaca e colunas de 2 a 10, procede-se nova diluição e todos os extratos partiram da diluição de 4.000 µg/mL (linha A); 4.000 µg/mL (linha B); 2.000 µg/mL (linha C); 1.000 µg/mL (linha D); 500 µg/mL (linha E); 250 µg/mL (linha F); 125 µg/mL (linha G); 62,5 µg/mL (linha H).

Os orifícios de coluna 2 a 10 da linha A receberam 50 µL da diluição de 16.000 µg /ml. Os orifícios de linhas B referentes às colunas de 2 a 9 receberam 100 µL de extrato e a coluna 10 a droga padrão (Anfotericina B 1mg/mL). Após a homogeneização da linha B, procede à diluição de linha B a H de colunas de 2 a 10, ao final desprezar volume de 100 µl.

Ao final foi adicionado a suspensão de *Candida* sp. diluída 1:25 referente a escala n.1 de MacFarland. Os orifícios de

colunas de 2 a 10 e linhas de B a H receberam volume de 100 µL de suspensão de leveduras, os orifícios das linhas E a H referentes à coluna 11 recebe 100 µl da suspensão de leveduras, com o intuito de ser controle positivo para leveduras.

As placas então foram seladas com filme de polietileno e incubadas em estufa de crescimento aeróbio a temperatura de 37 °C, por período de 24/48 horas de incubação os orifícios A -11 e E -11; receberam 25 µL de solução reveladora de Alamar Blue na proporção 1:1 e solução de Tween 80 a 10% para a cepa. As placas então foram reincubadas por 24 horas a 37 °C. A presença de cor rósea indica crescimento microbiano e a presença de coloração azul, indica ausência de crescimento microbiano, para as cores intermediárias as placas foram reincubadas por mais 24 horas.

Avaliação da Cinética de Crescimento

O estudo de interferência dos extratos hidroalcoólicos de *S. spectabilis* e *R. officinalis* sobre a cinética de morte microbiana foi realizado através do método de contagem de células microbianas viáveis para fungos leveduriformes. A cultura de *C. albicans* mantida em Ágar Sabouraud Dextrose 4% foi empregada para elaborar suspensão 10⁶ UFC/mL.

Para a realização do controle foi adicionado em tubos de ensaio o volume de 4 mL de Caldo Sabouraud Dextrose estéril e 500 µL das suspensões das leveduras (10⁶ UFC/mL). Os respectivos tubos foram incubados a 35-37 °C por 24 horas, no decorrer do ensaio. Nos tempos determinados (zero, 30, 60, 90 e 120min), uma alíquota de 10 µL das soluções testes foi inoculada sobre em placas de Ágar Sabouraud Dextrose para determinação da contagem de colônias. As placas inoculadas foram incubadas a 35-37 °C durante 24 horas, sendo os testes realizados em triplicata. O efeito cinético foi testado frente aos extratos hidroalcoólicos de *R. officinalis* e *S. spectabilis*.

Os testes foram realizados em triplicata e como controle de droga foi empregado solução de hipoclorito 1%. Avaliou-se o efeito sobre a cinética, separando 09 (nove) tubos de vidro estéreis, devidamente identificados; cada tubo recebeu o volume de 0,2mL de suspensão

fúngica padronizada na escala n.0,5 de Mac Farland (1,5x10⁶ microrganismos/mL); 1,8 mL de Caldo Sabouraud Dextrose e 2 mL do extrato hidroalcoólico, nas respectivas concentrações (4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5 µg/mL) para cada planta; separou-se o tubo de número 8 para controle positivo (crescimento) e o número 09 como controle de droga (hipoclorito de sódio 1%). Os tubos foram devidamente incubados à temperatura de 37 °C em estufa nos tempos de zero, 30, 60, 90 e 120 minutos. Para cada tempo cumprido, realizou-se a semeadura de 10µL do conteúdo do tubo em placas de Ágar Sabouraud-Dextrose, incubadas por 35-37 °C e realizada a contagem do crescimento.

Determinações antifúngicas

A realização foi observada em placa de 96 Weels, configurando crescimento positivo de leveduras em coluna de número 11 onde foi adicionado nas linhas de A-D 50µl de Caldo Mueller Hinton e 50µl da suspensão de *C.albicans* na escala n.0.5 de Mac Farland, configurando o controle positivo de crescimento. Para realização do controle de droga foram empregados os Weels de E-H, os mesmos receberam 50µl da suspensão de *C. albicans* na escala n.0.5 e 50µl da solução de Anfotericina B 1m/mL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o presente estudo foi aplicada a metodologia de microdiluição em placa, com a finalidade de avaliação antifúngica empregando revelador crescimento Alamar Blue Assay – MABA. Os testes realizados foram avaliados em triplicata, destinando maior padrão de confiabilidade. Os extratos foram testados frente à cepa padrão de *C. albicans* ATCC 10231.

De acordo com a Tabela 1, a fração hidroalcoólica do extrato de *S. spectabilis* apresentou efeito antifúngico na concentração de 500 µg/mL a CIM correspondente. Por se tratar de uma fração hidroalcoólica resultados em concentrações maiores como 1000 e 2000 µg/mL, poderão ser testados em outras metodologias, com o intuito de avaliar frações do extrato e também a possibilidade de redução do CIM apresentado neste estudo.

Tabela 1. Atividade antifúngica frente à cepa *Candida albicans* ATCC 10231 empregando extrato hidroalcoólico de *Senna spectabilis*.

Microrganismo	Concentração µg/mL	CIM*
Cepa padrão <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	2000	Observado
	1000	Observado
	500	Observado
	250	Não Observado
	125	Não Observado
	62,5	Não Observado

Não observado= crescimento normal; Observado= efeito inibitório exercido pelo extrato; C+ crescimento normal frente ao extrato; C- crescimento inibido quando exposto ao extrato.

*CIM – Concentração mínima Inibitória.

Para a Tabela 2, o efeito antifúngico na concentração de 250 µg/mL foi verificado quando analisamos o extrato e seus

respectivos efeitos, destacamos ainda, a capacidade de reprodutibilidade.

Tabela 2. Atividade antifúngica frente à cepa *Candida albicans* ATCC 10231 empregando extrato hidroalcoólico de *Rosmarinus officinalis*.

Microrganismo	Concentração µg/mL	CIM
Cepa padrão <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	2000	Observado
	1000	Observado
	500	Observado
	250	Observado
	125	Não Observado
	62,5	Não Observado

Não observado = crescimento normal; Observado = efeito inibitório exercido pelo extrato; C+ crescimento normal frente ao extrato; C- crescimento inibido quando exposto ao extrato.

Para as determinações antifúngicas onde o agente extrator foi mistura hidroalcoólica, não foi possível observar CIMs que pudessem destacar efeitos consideráveis, tendo visto mesmo

empregando um extrato bruto, as concentrações foram muito acima do tolerável e do aceitável para considerar como promissor (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. Estudo cinético e antifúngico frente à cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 empregando extrato hidroalcoólico de *Senna spectabilis*.

Tempo de Exposição	Concentração µg/mL		Resultados					
	4000	2000	1000	500	250	125	62,5	
Zero	+	+	+	+	+	+	+	
30	-	-	+	+	+	+	+	
60	-	-	-	+	+	+	+	
90	-	-	-	+	+	+	+	
120	-	-	-	-	+	+	+	

- A placa controle apresentou média de 40 UFC/mL
- O Sinal (-) negativo = denota redução da população de células viáveis; sinal (+) positivo denota crescimento normal, os escores foram referenciados conforme amostra padrão.

S. spectabilis apresentou atividade frente a cepa de *C. albicans* ATCC 10231, destaca-se os tempos de 60,90 e 120 minutos de exposição, configurando a necessidade de tempo e contato para ocorrência do efeito.

Tabela 4. Estudo cinético e antifúngico frente à cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 empregando extrato hidroalcoólico de *Rosmarinus officinalis*.

Tempo de Exposição	Concentração µg/mL		Resultados					
	4000	2000	1000	500	250	125	62,5	
Zero	+	+	+	+	+	+	+	
30	-	-	-	+	+	+	+	
60	-	-	-	-	+	+	+	
90	-	-	-	-	+	+	+	
120	-	-	-	-	+	+	+	

O Sinal (-) negativo = denota redução da população de células viáveis; sinal (+) positivo denota crescimento normal, os escores foram referenciados conforme amostra padrão.

DISCUSSÃO

Segundo Nascimento et al. (16), o uso de plantas para curar doenças infecciosas tem sido extensivamente aplicada pelas pessoas. Informações da literatura e os seus resultados revelam grande potencial das plantas para tratamentos terapêuticos, apesar do fato que elas não tenham sido completamente estudadas, outros estudos deverão ser conduzidos.

Em estudo realizado por Oliveira et al. (17) e Oliveira (18), observou que existe efeito direto na determinação de atividade cinética quando se emprega óleos essenciais, o que acentua a morte microbiana quando o tempo de exposição se torna maior. Para Freire et al. (3), o efeito do óleo essencial de *R. officinalis*, apresentou efeito antifúngico frente a cepas de *C. albicans*, o efeito antifúngico foi melhor observado de acordo com o tempo de exposição. Estudo realizado por Lima et al. (19) identificou atividade antifúngica do óleo essencial de *R. officinalis*, empregando a técnica de difusão em agar. Cavalcanti et al. (13) realizaram avaliação do óleo essencial de *R. officinalis* frente à cepa de *C. albicans* e *C. tropicalis*, no estudo foi observado crescimento quando expostas à concentração 0,5625 mg/mL. De acordo com Hussain et al. (20), o óleo essencial de alecrim possui boa atividade antimicrobiana com halo de inibição, sendo comparado ao controle ciprofloxacino, atribuindo a atividade ao composto majoritário 1,8-cineol, a presença de α -pineno, cânfora, verbenona e borneol.

Segundo Sikkema (21), *R. officinalis* possui terpenos em grande quantidade, metabólito secundário com características lipofílicas que interfere nas estruturas de

membrana, causando sua expansão, aumento de fluidez ou desordem da estrutura da mesma, além de inibição de enzimas ali embebidas. astro et al. (22) verificaram a susceptibilidade de *C. albicans* e *C. tropicalis* frente ao óleo de *R. officinalis*, todas as cepas mostraram-se sensíveis; extratos de *R. officinalis* também foram eficientes frente à cepa de *C. albicans*.

Estudo realizado por Costa et al. (23) avaliou a atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos de *R. officinalis* e folhas de *S. spectabilis*. Relataram que os extratos possuem atividade frente à *C. albicans* na concentração de 250 µg/mL para ambos os extratos. A diferença de atividade antimicrobiana entre as mesmas espécies vegetais pode ser explicada devido a alguns fatores relacionados ao cultivo, como tipo de solo, luz e umidade ou época da colheita, que podem interferir na composição química da planta (24).

De acordo com Nascimento et al. (16), a atividade antifúngica de extratos vegetais de *R. officinalis*, utilizando extratos hidroalcoólico e cepas de *C. albicans*, em testes realizados em meio garágar e extrato de *R. officinalis* incorporados, foi possível determinar atividade inibitória de crescimento, levando em consideração a presença de halos menores que 60mm de diâmetro.

CONCLUSÕES

Os extratos de *S. spectabilis* e *R. officinalis* apresentaram atividade frente à *C. albicans* nas concentrações de 500 e 250 µg/mL, respectivamente. O estudo cinético revelou que ao se colocar os extratos em contato com a *C. albicans* há efeito proporcional ao tempo de exposição, com destaque para a observação no tempo inicial 30 minutos.

REFERÊNCIAS

- (1) FRANÇA, I.S.X. et al. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Rev. Bras. Enferm.** v.61, n.2, p.201-208, 2008.
- (2) MORALES, A. P; CALDAS, C. De volta à era pré-antibiótica: a busca emergencial por novos arcabouços. **Revista Ciência e Cultura**, v.62, n.4, p 14-16, 2010.
- (3) FREIRE, I.C.M. et al. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* sobre a cinética do crescimento de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v.16, n.3, p.343-346, 2012.
- (4) ARANTES, V. P. et al. Estudo comparativo da atividade antibacteriana de extratos vegetais de *Senna spectabilis*, *Rosmarinus officinalis* e *Eugenia uniflora* frente à cepa padrão de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615. **Arq. Cienc. Saúde UNIPAR, Umuarama**, v.20, n.3, p.151-158, set./dez. 2016.
- (5) ALVES, L.F.; AMARAL, A.C.F. Coletânea Científica de Plantas de uso medicinal. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**. Botucatu, v.7, n.1, p.129-135, 2002.
- (6) VIEGAS JR, C. et al. Further bioactive piperidine alkaloids from the flower and Green fruits of *Cassia spectabilis*. **Journal of natural products**, v.67, p.809-910, 2004.
- (7) SANGENTHA, S. et al. In situ TEM ou SEM studies on the antimicrobial activity and prevention of *Candida albicans* biofilm by *Cassia spectabilis* extract. **Micron**, v.40, p. 439-443, 2009.
- (8) LORENZI, H.; MATOS.F.J.A. Plantas medicinais do Brasil – nativas e exóticas. São Paulo: Instituto Plantarium de estudo da flora, Ltd. p.233-234, 2006.
- (9) CARDOSO, S.T. Papel do ATP nas infecções de macrófagos por *Candida albicans*. 2013, 59f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia) Faculdade de ciências e tecnologia-Universidade de Coimbra, 2013.
- (10) DARÃES, G.V. et al. Suscetibilidade de *Candida albicans* a extratos de *Azadirachta indica* (nim). **Braz. Oral. Res.** São Paulo, v.4, p-12-17, 2005.
- (11) BARBEDO, L.S.; SGARBI, D,B,G. Candidíase. **J. bras. doenças sex. transmissíveis**, v.22, n.1, p.22-38, 2010.
- (12) EL-MAHMOOD. A. M.; OGBONNA, O. B.; RAJI, M. The antibacterial activity of *Azadirachta indica* (neem) seeds extracts against bacterial pathogens associated with eye and ear infections. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.4, n.14, p. 1414-1421, 2010.
- (13) CAVALCANTI, Y.W.; ALMEIDA, L.F.D.; PADILHA, W.W.N. Atividade antifúngica e antiaderente do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* sobre *Candida*. **Arqu. Odontol: Belo Horizonte**, v.47, n.3, p.146-152, 2011.
- (14) FRANZBLAU, S. G. et al. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the MicroplateAlamar Blue Assay. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, n.2, p.362-366, 1998.
- (15) NCCLS. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: Approved guideline M26-A. Wayne, Pennsylvania, USA, 1999.
- (16) NASCIMENTO, G. G. H. et. Al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. **Braz. Jour. of Microb.**, v.31, p.247-256, 2000.
- (17) OLIVEIRA, T.L. et al. Atividade antifúngica e cinética de morte microbiana de extratos obtidos de *Streptomyces* spp. isolados de solos paraibanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.1, p60-64, 2010.
- (18) OLIVEIRA, L. M. L.; *Punica granatum*: quantificação de polifenóis de extratos e potencial antifúngico contra *Candida albicans*. 2013. 41fl. (Monografia – UNESP). Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho – Unesp, Araçatuba, 2013.
- (19) LIMA, I.O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v.16, n.2, p.197-201, 2006.

- (20) HUSSAIN, A. I. et al. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. **Braz. J. Microb.**, v.41. p. 070-1078. 2010.
- (21) SIKKEMA, J. DE BONT J.A.M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiology Reviews**, v.59, p.201-222, 1995.
- (22) CASTRO, R.D.; LIMA, E.O. Atividade antifúngica dos óleos essenciais de sassafrás (*Ocotea odorífera*) e Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) sobre o gênero *Candida*. **Rev. Bras. Pl. Med. Botucatu**, v.13, n.2, p.203-208, 2011.
- (23) COSTA, G. M. et al. Effect of plant extracts on planktonic growth and biofilm of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.**, v.4, n.6, p.908-917, 2015.
- (24) CORREA JUNIOR, C.; MING, L. C.; SCHEFER, M. C. Cultivo de plantas medicinais, condimentares aromáticas. Curitiba: Copiright Emater - Paraná, 80p. 1991.

Enviado: 05/06/2019
Revisado: 17/03/2020
Aceito: 16/04/2020