

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

ROBERTA OLIVEIRA DE SOUSA

**PERFIL QUÍMICO, ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E MODULATÓRIA DOS
EXTRATOS AQUOSO E METANÓLICO DE *Libidibia ferrea* (Mart.) L.P. Queiroz
(Pau-ferro)**

Juazeiro do Norte – CE
2019

ROBERTA OLIVEIRA DE SOUSA

**PERFIL QUÍMICO, ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E MODULATÓRIA DOS
EXTRATOS AQUOSO E METANÓLICO DE *Libidibia ferrea* (Mart.) L.P. Queiroz
(Pau-ferro)**

Artigo científico apresentado à Coordenação do
Curso de Graduação em Biomedicina do Centro
Universitário Leão Sampaio, em cumprimento
às exigências para a obtenção do grau de
bacharel em Biomedicina.

Orientador: Me. Cícero Roberto Nascimento
Saraiva

ROBERTA OLIVEIRA DE SOUSA

**PERFIL QUÍMICO, ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E MODULATÓRIA DOS
EXTRATOS AQUOSO E METANÓLICO DE *Libidibia ferrea* (Mart.) L.P. Queiroz
(Pau-ferro)**

Artigo científico apresentado à Coordenação do
Curso de Graduação em Biomedicina do Centro
Universitário Leão Sampaio, em cumprimento
às exigências para a obtenção do grau de
bacharel em Biomedicina.

Orientador: Me. Cícero Roberto Nascimento
Saraiva

Data de aprovação: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Me. Cícero Roberto Nascimento Saraiva
Orientador

Prof^ª Ma. Tassia Thais Al Yafawi
Examinador 1

Prof^ª Esp. Livia Maria Garcia Leandro
Examinador 2

**PERFIL QUÍMICO, ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E MODULATÓRIA DOS
EXTRATOS AQUOSO E METANÓLICO DE *Libidibia ferrea* (Mart.) L.P. Queiroz
(Pau-ferro)**

Roberta Oliveira de Sousa¹; Cícero Roberto Nascimento Saraiva²

RESUMO

O estudo teve como objetivo identificar o perfil fitoquímico e avaliar a atividade antifúngica e modulatória dos extratos aquoso e metanólico de *Libidibia ferrea* (Mart.) L.P. Queiroz. As atividades foram realizadas entre agosto e setembro de 2019 no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Leão Sampaio (Juazeiro do Norte - CE), Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN) da Universidade Regional do Cariri (URCA). Os frutos maduros da espécie *Libidibia ferrea* foram coletados no Sítio Riacho, no município de Vieirópolis no Estado da Paraíba, após foram obtidos os extratos aquoso e metanólico para a realização dos testes. Os constituintes químicos foram analisados em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e os extratos foram testados frente as espécies de *Candida albicans* (CA 40006 e CA 4387) e *Candida tropicalis* (CT 40042 CT 4262) pelo método de microdiluição e para a modulação, a droga de escolha foi o Fluconazol. Na análise de constituintes químicos foram detectados taninos hidrolisáveis. A IC₅₀ do extrato aquoso apresentou um valor bastante inferior ao do controle com Fluconazol frente a *C. albicans*, já frente a *C. tropicalis* os produtos testados apresentaram um valor da IC₅₀ maior que a do controle. Na modulação, os produtos testados potencializaram a ação do fluconazol frente a *C. albicans* e apenas o extrato aquoso potencializou o efeito antifúngico frente a cepa de *C. tropicalis*. Com isso, foram demonstrados promissores para que sejam feitas pesquisas clínicas, na busca de compostos que sirvam como alternativas terapêuticas aos antifúngicos convencionais, numa tentativa de combater a crescente resistência fúngica a esses fármacos.

Palavras-chave: Fungos. Plantas medicinais. Resistência antifúngica. *Candida albicans*. *Candida tropicalis*.

**CHEMICAL PROFILE, ANTIFUNGAL AND MODULATORY ACTIVITY OF THE
WATER AND METHANOLIC EXTRACTS OF LIBIDIBIA FERREA (MART.) L.P.
Queiroz (Iron stick)**

ABSTRACT

The objective of this study was to identify the phytochemical profile and to evaluate the antifungal and modulatory activity of the aqueous and methanolic extracts of *Libidibia ferrea* (Mart.) L.P. Queiroz. The activities were performed between August and September 2019 at the Laboratory of Microbiology of the Leão Sampaio University Center (Juazeiro do Norte - CE), Natural Products Research Laboratory (LRPN) of the Regional University of Cariri (URCA). The ripe fruits of the species *Libidibia ferrea* were collected at Sítio Riacho, in the county of Vieirópolis, Paraíba State, after were obtained the aqueous and methanolic extracts for the tests. The chemical constituents were analyzed by high performance liquid chromatography and the extracts were tested against *Candida albicans* (CA 40006 e CA 4387) e *Candida tropicalis* (CT 40042 CT 4262) species by the microdilution method and for

¹ Discente do curso de Biomedicina do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio, robertaoliveirasousa@gmail.com

² Docente do curso de Biomedicina do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio, cicero roberto@leaosampaio.edu.br

the modulation, the drug of choice was Fluconazole. In the analysis of chemical constituents, hydrolysable tannins were detected. The IC₅₀ of the aqueous extract presented a value much lower than the control with Fluconazole against *C. Albicans*, compared to *C. tropicalis*, the tested products presented an IC₅₀ value higher than the control. In the modulation, the tested products potentiated the action of fluconazole against *C. albicans* and only the aqueous extract potentiated the antifungal effect against *C. tropicalis* strain. Thus, have been demonstrated for to do clinical research to find compounds that serve as therapeutic alternatives to conventional antifungals in an attempt to combat the growing fungal resistance to these drugs.

Key-words: Fungi. Medicinal plants. Antifungal resistance.

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais como uma opção terapêutica, conhecida como fitoterapia, é uma prática milenar no mundo, uma rica tradição medicinal e é descendente da experiência que a população adquire com o meio botânico que a circunda. O repasse desses saberes de geração em geração, estimula os pesquisadores através desse conhecimento empírico, à um estudo intenso para a promoção da saúde (FIRMO, 2011).

Os metabólitos secundários presentes nessas plantas dão a ela um poder terapêutico que tem sido confirmado com os diversos estudos na tentativa de buscar novas medidas de tratamento para infecções que sejam efetivas e tragam menor efeitos adversos para a comunidade. Dentre as plantas medicinais utilizadas na clínica popular, está *Libidibia ferrea* (Mart.) L.P. Queiroz pertencente à família Leguminosae encontrada principalmente no Norte e Nordeste do país e conhecida popularmente como pau-ferro ou jucá (FRANCINEYDE; FBIO; LEONOR, 2014).

O pau ferro é uma grande árvore nativa do Brasil e, por isso, o Ministério da Saúde incluiu a espécie na Lista Nacional de Plantas Medicinais importantes para o Sistema de Saúde (KOBAYASHI et al., 2015). Ele é descrito na literatura apresentando inúmeras propriedades como anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana, antiulcerogênica e em virtude do seu amplo uso pela população, busca-se realizar cada vez mais estudos para a comprovação de seus efeitos terapêuticos. Compostos como os taninos, flavonóides, fenois, triterpenos, saponinas são relatados como presentes no extrato da planta e são eles responsáveis por proporcionarem a atividade terapêutica, como ação contra infecções, por exemplo (FIGUEIREDO et al., 2016).

As infecções fúngicas oportunistas tem se tornado um desafio na realidade clínica, pois aumentaram bastante nas últimas décadas e estão aliadas ao aumento na taxa de mortalidade devido a resistência que vêm adquirindo, mesmo com a quantidade de antimicóticos disponíveis comercialmente. (ABÍLIO et al., 2014).

O surgimento de cepas multirresistentes aos antifúngicos já disponíveis no mercado está se tornando uma das importantes causas de mortalidade no mundo. O gênero *Candida* é o mais responsável pelas fungemias causadas principalmente nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs). É isso que tem motivado a busca entre o reino vegetal de substâncias com ação fungicida que sejam efetivas e tragam menor efeitos adversos para a comunidade (MÍMICA et al., 2009).

Tendo em vista a problemática do surgimento de cepas multirresistentes aos antifúngicos já disponível, torna-se relevante a busca de produtos naturais que consigam apresentar boa atividade antifúngica. O objetivo do presente estudo é identificar o perfil químico e avaliar a atividade antifúngica e modulatória dos extratos aquoso e metanólico de *Libidibia ferrea* (Mart.) L.P. Queiroz.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LOCAL DA PESQUISA E PERÍODO DE REALIZAÇÃO DOS TESTES

As atividades foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Leão Sampaio (Juazeiro do Norte - CE) e no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN) da Universidade Regional do Cariri (URCA), durante o período de Agosto a Setembro de 2019.

2.2 MATERIAL VEGETAL

Os frutos maduros da espécie *Libidibia ferrea* foram coletados no Sítio Riacho, no município de Vieirópolis no Estado da Paraíba. A identificação botânica e o depósito da exsicata foram realizados no Herbário Lauro Pires Xavier (JPB), Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

2.3 OBTENÇÃO EXTRATOS AQUOSO E METANÓLICO DE *Libidibia ferrea* (Mart.) L.P. Queiroz

Para preparação dos extratos, a vagem foi separada das sementes, tendo a superfície de contato aumentada, onde foram colocadas em dois recipientes, um contendo metanol puro e

outro contendo água, onde permaneceram submersas por 72h. Após esse período, foram filtradas e concentradas em evaporador rotativo a vácuo (BRASILEIRO et al., 2006).

2.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

Para a análise dos constituintes químicos, foram preparadas soluções dos extratos obtidos à 1,0 mg/mL para análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Shimadzu Prominence LC-20AT, Shimadzu, Kyoto, Japan), constituído por duas bombas LC-6AT, degaseificador DGU-20As, forno de coluna CTO-20AC, detector de arranjo diodos (DAD) SPD-20A injetor manual Rheodyne 7125i, com um loop 20 µL, ou autoinjeter (SIL-20A) e módulo de comunicação CBM-20A, controlado pelo software LcSolution.

2.5 ENSAIOS ANTIFÚNGICOS: PREPARO DA SOLUÇÃO INICIAL E DE TESTE

O preparo da solução inicial das amostras foi realizado diluindo 0,150g dos extratos em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO – Merck, Darmstadt, Alemanha), para a obtenção de uma concentração inicial. A partir desta concentração, será realizada diluição em água destilada estéril a fim de atingir a concentração de 16 384 µg/mL (solução teste).

2.6 LINHAGENS, DROGAS UTILIZADAS E MEIOS DE CULTURA

Os microrganismos que foram utilizados nos testes de sensibilidade aos produtos naturais foram obtidos do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN) - URCA. Foram utilizadas duas linhagens padrão de leveduras CA 40006 e CT 40042 e duas linhagens resistentes CA 4387 CT 4262. O fluconazol foi utilizado como droga de referência no teste de modulação do fármaco comercial.

2.7 INÓCULO

Todas as linhagens foram inicialmente mantidas em tubos de ensaio contendo ASD inclinado, sob refrigeração (8°C), no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Leão Sampaio (Juazeiro do Norte - CE). Para os testes da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM), na preparação do inóculo dos fungos, inicialmente os isolados serão cultivados em meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) vertido

em placa de Petri a 37 °C por 24 horas (overnight). A partir destas, serão preparadas suspensões dos microrganismos em tubos contendo 3 mL de solução estéril (NaCl a 0,9%). Em seguida, essas suspensões serão agitadas com auxílio do aparelho vórtex e a turbidez será comparada e ajustada àquela apresentada pela suspensão de sulfato de bário do tubo 0,5 da escala de McFarland, a qual corresponde a um inóculo de aproximadamente 10^5 unidades formadoras de colônias/mL – UFC/mL (SOUZA et al., 2007).

2.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A determinação da CIM foi realizada pela técnica de microdiluição, utilizando placas contendo 96 cavidades com fundo chato e em triplicata (ELLOF, 1998; SOUZA et al., 2007). Em cada orifício da placa foram adicionados 100 µL do meio líquido CSD duplamente concentrado. Para distribuição na placa de microdiluição serão preparados tubos eppendorf® contendo cada um deles 1,5 mL de solução contendo 1350 µL de CSD duplamente concentrado e 150 µL da suspensão fúngica. A placa foi preenchida no sentido numérico adicionando-se 100 µL desta solução em cada poço (placa de 96 poços) e em seguida procedendo-se a microdiluição seriada com a solução de 100 µL do produto natural (JAVADPOUR et al., 1996). A revelação da CIM será feita pela observação da turbidez provocada pelo crescimento. Será definido a CIM para os produtos testados, como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico verificado nos orifícios, quando comparado com o crescimento controle. Variando nas concentrações de 8192 a 4 µg/mL. As placas serão levadas à estufa por 24 h à 37 °C.

2.9 TESTE DE MODULAÇÃO DO FLUCONAZOL

A solução contendo o óleo essencial foi testada em concentração sub-inibitória (CIM/16). O volume de 100 µL de uma solução contendo CSD, 10% do inóculo e produto natural foram distribuídos em cada poço no sentido alfabético da placa. Logo após, 100 µL de cada antifúngico, individualmente, foi misturado ao primeiro poço, procedendo a microdiluição em série, numa proporção de 1:1 até a penúltima cavidade, a última cavidade será usada para controle de crescimento fúngico. As concentrações do antifúngico variarão gradualmente de 512 a 0,5 µg/mL (COUTINHO et al., 2008). Serão utilizados controles de diluição dos produtos naturais, onde o inóculo será substituído por salina, e o controle de esterilidade do meio. A leitura será feita em espectrofotômetro, no comprimento de onda

de 630 nm, ELISA Termoplate®, no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN) da Universidade Regional do Cariri (URCA).

2.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

Em cada poço da placa do teste da CIM, foi adicionada uma haste estéril, que após homogeneizar o meio contido na cavidade, foi subcultivada em placa de Petri contendo ASD, através da transferência de uma pequena alíquota da solução teste (meio + inóculo + produto natural) para verificação de viabilidade celular. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, e foram verificadas quanto ao crescimento ou não crescimento de colônias de *Candida*. A CFM foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento de colônia fúngica frente ao produto natural (ERNST et al., 1999).

2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em média geométrica. Para análise estatística foi aplicada ANOVA two-way seguida do teste de Bonferroni, considerando significância de $p \leq 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PERFIL QUÍMICO

Os perfis cromatográficos dos extratos foram obtidos utilizando UPLC / DAD e LC-ESI-MS. A ionização por electropulverização (ESI) no modo de íons negativos foi usada para analisar taninos nos dois extratos. A análise dos extratos por MALDI-TOF confirmou a presença de taninos hidrolisáveis.

Os taninos são o quarto grupo de constituintes mais presentes no metabolismo secundário das plantas, podendo ser encontrado em qualquer parte dela. Esse composto fenólico tem grande interesse econômico e ecológico. Eles são a segunda maior classe entre os compostos fenólicos e podem ser classificados em 2 grupos que são os hidrolisáveis e os condensados dependendo da sua estrutura molecular (MELO, 2008).

Grande parte dos compostos fenólicos não estão de forma livre na natureza, mas encontramos em forma de ésteres ou heterosídeos, sendo assim solúveis em água e solventes

orgânicos, eles são muito reativos. Os taninos hidrolisáveis são ésteres de ácidos gálicos e elágicos comumente formados pela β -D-glicose que são facilmente hidrolisados à açúcares e ácidos carboxílicos e possui a propriedade de se ligar as proteínas e precipitar (MONTEIRO et al., 2005).

Diversos estudos indicam que os taninos são responsáveis pela cor e adstringência de alguns frutos, que plantas ricas com esse composto são utilizadas na medicina tradicional para diversas situações como processos inflamatórios, tratamento de feridas, queimaduras, além de apresentarem boa atividade antimicrobiana e antioxidante. O mecanismo de ação desse composto pode ser entendido pela capacidade que o mesmo possui em precipitar proteínas formando uma camada protetora e impedindo a proliferação de microrganismos (PANSERA et al, 2003).

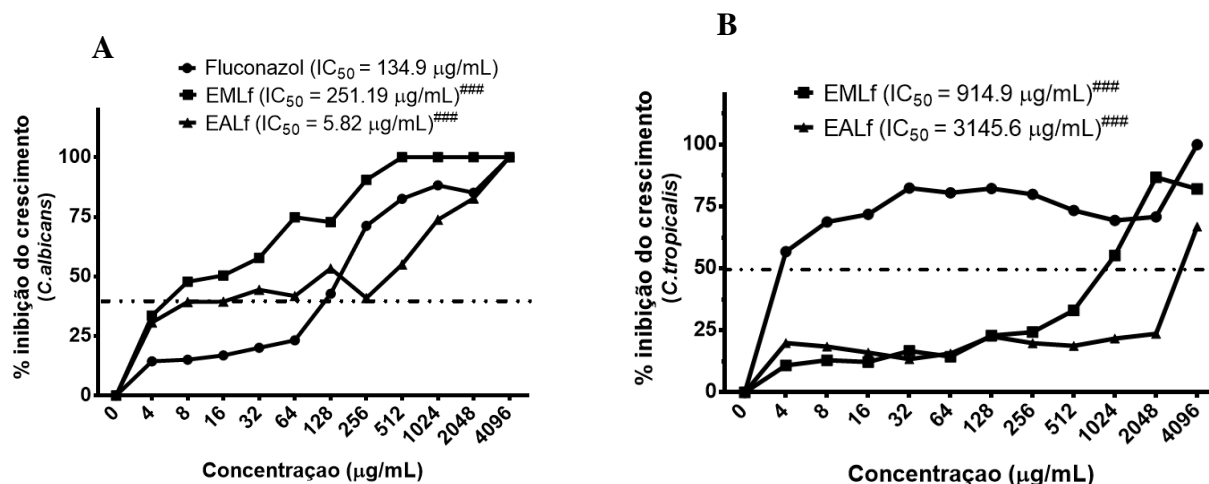
Espécies como a *Mimosa tenuiflora*, conhecida popularmente como jurema preta, e a *Mimosa arenosa*, que é conhecida popularmente como jurema branca, são descritas na literatura apresentando também taninos em sua composição e conseguindo ter uma boa atividade antimicrobiana (PEREIRA et al, 2015). Em uma avaliação fitoquímica realizada por Kobayashi (2015), também foi encontrada a presença de taninos nos frutos do pau ferro, podendo indicar que esse composto está presente nessa espécie, independente do material vegetal utilizado para ensaios de caracterização química.

3.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Os valores das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos extratos aquoso e metanólico de *Libidibia ferrea* (Mart.) L.P. Queiroz e do antifúngico comercial fluconazol, foram de 4 096 μ g/mL, frente as espécies de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, mesmo resultado obtido para Concentração Fúngica Mínima (CFM).

Na figura 1A e 1B apresentadas abaixo, estão demonstrados os gráficos das Concentrações Inibitórias Mínimas do EMLf, EALf e do antifúngico fluconazol (Fluc), frente as espécies de *Candida albicans* (CA INCQS 40006) e a de *Candida tropicalis* (CT INCQS 40042), respectivamente. No gráfico 1A o IC₅₀ EALf apresentou um valor bastante inferior ao do controle com Fluconazol frente a *C. albicans*. No gráfico 1B os produtos testados apresentaram um valor da IC₅₀ maior que a do controle.

Figura 1: Concentração Inibitória Mínima dos extratos aquoso e metanólico de *Libidibia ferrea* (Mart.) L.P. Queiroz e do Fluconazol frente a *C. albicans* (A) e *C. tropicalis* (B).



A IC_{50} significa a concentração que conseguiu inibir pelo menos 50% dos microorganismos. Na literatura, Rocha et al. (2019) testou a espécie *Hyptis martiusii* Benth (Lamiaceae) utilizando a mesma metodologia, e foram encontrados resultados para inibição dos fungos semelhante ao presente estudo, onde o produto natural conseguiu ter maior atividade inibitória frente a *Candida albicans*. Em pesquisas desenvolvidas por Ferreira (2012), observou que o extrato aquoso da *Libidibia ferrea* apresenta inibição ao ser testado frente a *Candida albicans*.

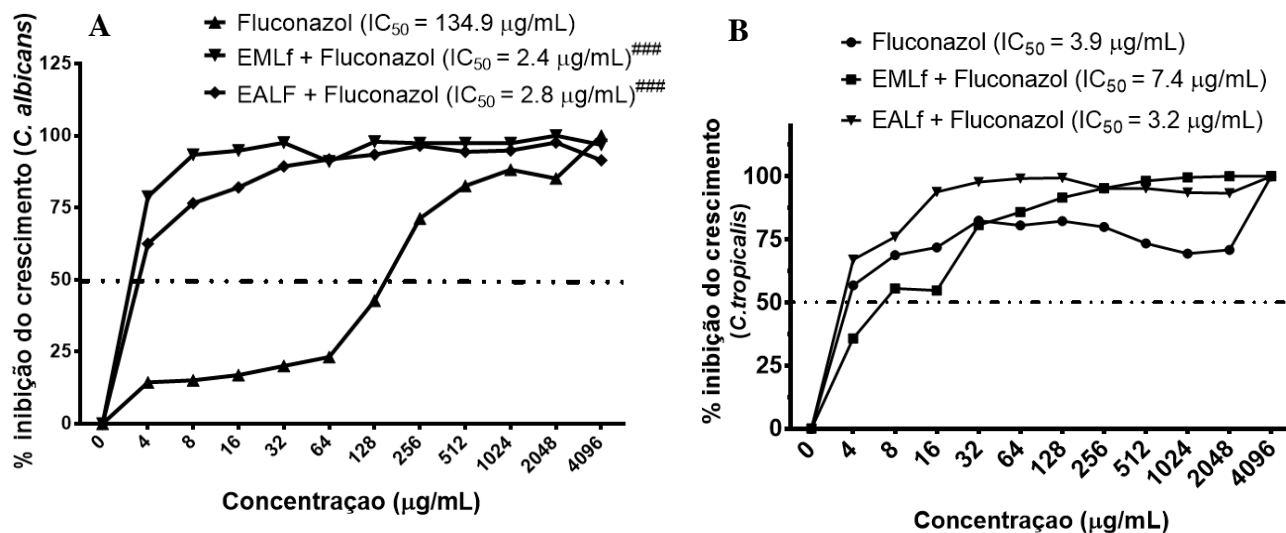
As diferenças entre os valores de CIM em produtos naturais, mesmo em achados que utilizaram a mesma cepa de *Candida*, podem ser atribuídas à alguns fatores como a sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, poluição atmosférica, altitude, e indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos, podem levar a variações no conteúdo dos metabólitos presentes no produto natural (REZENDE; COCCO, 2002).

3.3 POTENCIAL MODULATÓRIO

Em relação aos testes de modulação, os resultados estão expressos na Figura 2, representada abaixo. Na figura 2A os produtos testados potencializaram a ação do fluconazol frente a *C. albicans*. Na figura 2B o EALf potencializou o efeito antifúngico frente a cepa de *C. tropicalis* quando modulado com o fluconazol.

Figura 2: Potencial Modulatório dos extratos aquoso e metanólico de *Libidibia ferrea* (Mart.)

L.P. Queiroz



As utilizações dos extratos associados ao Fluconazol podem potencializar ou não o efeito do mesmo, é uma maneira alternativa de reduzir a dose do antifúngico para o tratamento causando assim menos efeitos colaterais ao paciente. A combinação dos compostos pode mudar a permeabilidade da membrana das cepas fúngicas, favorecendo a passagem intracelular do antifúngico, que atua inibindo a síntese do ergosterol e aí causando aumento da morte do microrganismo em menor concentração (JÚNIOR et al., 2015).

Muitos estudos já descritos na literatura conseguem demonstrar a ação moduladora de diversos componentes dos produtos naturais a uma droga de escolha. Endo et al. (2010), relataram que a *Punica granatum* conseguiu apresentar uma ação sinérgica ao Fluconazol, como também foi possível observar no presente estudo, onde o extrato aquoso e metanólico da *Libidibia ferrea* conseguiram potencializar o efeito do antifúngico frente a *Candida albicans*.

4 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos é possível concluir que o EALF apresentou considerável potencial antifúngico frente a *C. albicans*, além de apresentar uma ação sinérgica quando utilizado com o fluconazol, tornando sua ação mais eficiente, podendo o mesmo ser utilizado numa concentração menor que a do antifúngico sozinho. Já o EMLf apresentou efeito

sinérgico quando associado ao antifúngico para *C. albicans* e efeito antagônico frente a *C. tropicalis*.

Com isso, os resultados foram demonstrados promissores para que sejam feitas novas pesquisas clínicas, na busca de compostos isolados que sirvam como alternativas terapêuticas aos antifúngicos convencionais, em uma tentativa de combater a crescente resistência fúngica a esses fármacos e diminuir os efeitos colaterais que são causados ao paciente durante o tratamento.

REFERÊNCIAS

- ABÍLIO, V. M. F. et al. Actividad antifúngica de productos naturales indicados por vendedores de hierbas (raizeiros) para el tratamiento de la candidiasis oral, **Revista Cubana de Estomatología**, v.51, n. 3, 2014.
- ELLOF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determined the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v.1, n.1, 1998.
- FIGUEIREDO, F.G. et al. Antimicrobial activities of natural products from libidibia ferrea (Mart. Ex.Tul.) L.P. Queiroz Var. Ferrea. In: Collins, E. **Antibacterials: Synthesis, properties and biological activities**. New York: Nova Science Publishers, 2016.
- FIRMO, W. C. A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, v. 18, 2011.
- FRANCINEYDE, A.S; FBIO S. B. S; LEONOR, C. M. Biotechnical application of arbuscular mycorrhizal fungi used in the production of foliar biomolecules in ironwood seedlings [*Libidibia ferrea* (Mart. ex. Tul.) L.P. Queiroz var. *ferrea*]. **Journal Of Medicinal Plants Research**, v. 8, n. 22, 2014.
- KOBAYASHI, Y. T. S. et al. Avaliação fitoquímica e potencial cicatrizante do extrato etanólico dos frutos de Jucá (*Libidibia ferrea*) em ratos Wistar. **Brazilian Journal Of Veterinary Research And Animal Science**, v. 52, n. 1, 2015.
- MÍMICA, L. M. J. et al. Diagnóstico de infecção por Candida: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de susceptibilidade. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 1, 2009.
- BRASILEIRO, B. G. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 19, 2006.
- CALIXTO JÚNIOR, J. T. et al. Phytochemical Analysis and Modulation of Antibiotic Activity by *Luehea paniculata* Mart. & Zucc. (Malvaceae) in Multiresistant Clinical Isolates of *Candida* Spp. **Biomed Research International**, v. 2015, 2015.

COUTINHO, H. D. M. et al. In vitro anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*- MRSA strains. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 1, 2008.

Endo, E. H. et al. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 7, 2010.

ERNST E. J. et al. In vitro pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by time-kill methods. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.33, n.2, 1999.

FERREIRA, M. R. A. Triagem antifúngica de extratos obtidos de espécies vegetais do Nordeste Brasileiro. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2012.

JAVADPOUR, M. M. et al. Antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.1, n.1, 1996.

MELO, A. F. **Desenvolvimento preliminar de um biossensor enzimático para determinação de taninos hidrolisáveis**. Escola de Química: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: Uma abordagem da química a ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, 2005.

PANSERA, M. R. et al. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 1, 2003.

PEREIRA, A. V. et al. Análise da atividade antimicrobiana de taninos totais de plantas aromáticas do Nordeste brasileiro. **Revista Agropecuária Técnica**, v. 36, n. 1, 2015.

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

ROCHA, J. E. et al. HPLC-DAD analysis and antifungal effect of *Hyptis martiusii* Benth (Lamiaceae) against *Candida* strains. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 9, n. 3, 2019.

SOUZA, E. L. et al. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v.1, n.1, 2007.