

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E SOCIEDADE**

GEOVANA SAMARA DA SILVA CARVALHO

**ESTUDO “*IN VITRO*” DO EXTRATO BRUTO DA *HYPTIS SUAVEOLENS* (L.) POIT.
E *HYPTIS MUTABILIS* (RICH.) BRIG. COMO POSSÍVEL INIBIDORA DO
CRESCIMENTO DE LEVEDURAS DO GÊNERO *CÂNDIDA***

MOSSORÓ, RN

2018

GEOVANA SAMARA DA SILVA CARVALHO

**ESTUDO “*IN VITRO*” DO EXTRATO BRUTO DA *HYPTIS SUAVEOLENS* (L.) POIT.
E *HYPTIS MUTABILIS* (RICH.) BRIG. COMO POSSÍVEL INIBIDORA DO
CRESCIMENTO DE LEVEDURAS DO GÊNERO *CÂNDIDA***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Sociedade da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Saúde e Sociedade

Orientadora: Profa. Dra. Isabela Pinheiro Cavalcanti Lima.

MOSSORÓ, RN

2018

GEOVANA SAMARA DA SILVA CARVALHO

**ESTUDO “*IN VITRO*” DO EXTRATO BRUTO DA *HYPTIS SUAVEOLENS* (L.) POIT.
E *HYPTIS MUTABILIS* (RICH.) BRIG. COMO POSSÍVEL INIBIDORA DO
CRESCIMENTO DE LEVEDURAS DO GÊNERO *CÂNDIDA***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Sociedade da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Saúde e Sociedade.

Data da defesa: ____ / ____ / ____

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Isabela Pinheiro Cavalcanti Lima.
Universidade do Estado do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. Richardson Augusto Rosendo da Silva
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. João Bosco Filho.
Universidade do Estado do Rio Grande do Norte

DEDICATÓRIA

À Deus,
A tua palavra é lâmpada que
ilumina os meus passos e luz que
clareia o meu caminho. (Salmos 119:105)

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dra. Isabela Pinheiro Cavalcanti Lima, pela confiança, disponibilidade, por todos os ensinamentos e pela impecável condução deste meu trabalho.

À Prof^a. Dra. Glória Maria Gelle de Oliveira, pela colaboração ímpar.

Aos meus pais, Maria do Socorro e Valdeci Paulino, por me terem dado educação e valores, a quem eu rogo todas as noites a minha existência.

Ao meu esposo, Frederico Carvalho Lima de Abreu, que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades.

Ao meu filho, Rodrigo, que embora não tivesse conhecimento disto, iluminou de maneira especial os meus pensamentos para continuar e concluir a pesquisa, desde a primeira até a última etapa.

Aos meus irmãos, Joseilton, Jean e George meu agradecimento especial, pois sempre se orgulharam de mim e confiaram no meu trabalho.

Aos queridos amigos, Mara e Toninho, pelo incentivo e contribuição nos momentos de angústia.

Aos amigos do mestrado, pelos momentos divididos juntos.

A todos (as) que estiveram presentes e contribuíram de alguma forma nessa minha caminhada.

RESUMO

Sabe-se que pesquisas sobre o uso de plantas medicinais têm sido significativas nos últimos tempos. A pesquisa busca avaliar a atividade antifúngica das propriedades da *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. e *Hyptis. mutabilis* (Rich.) Brig. frente às cepas da *Candida albicans* *in vitro* isoladas. Estas plantas estão amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais. A análise pretende quantificar o extrato bruto das folhas da *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. e *Hyptis. mutabilis* (Rich.) Brig. necessários para inibir o crescimento desses fungos. Determinar quantitativamente essa atividade antimicótica *in vitro* dos extratos etanólico e metanólico sobre amostras antifúngicas isoladas e formular um fitoterápico capaz de combater a Candidíase. Todavia, os resultados das análises foram negativos para o objetivo pleiteado, podendo ser atribuído à localização geográfica de sua colheita, o Cerrado brasileiro, tendo em vista a variabilidade genética e química que apresenta essa espécie. Foi possível concluir que o resultado encontrado neste estudo, no entanto, abriu espaço para a realização de novas pesquisas, já que ratificou a influência da variabilidade genética e química dessas plantas de acordo com sua distribuição geográfica, sendo necessárias análises mais específicas para identificar e caracterizar essas diferenças de forma mais clara, em virtude de que ainda são escassas as pesquisas na área.

Palavras-chave: *Candida albicans*, Candidíase, Fitoterapia, Plantas medicinais.

ABSTRACT

It is known that research on the use of medicinal plants has been significant in recent times. The search seeks to evaluate the antifungal activity of the properties of the *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. and *Hyptis mutabilis* (Rich.) Brig. Opposite the strains of *Candida albicans* in vitro isolated. These plants are widely distributed in tropical and subtropical regions. . The analysis intends to quantify the gross extract of the leaves of the *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. and *Hyptis Mutabilis* (Rich.) Brig. Necessary to inhibit the growth of these fungi. Quantitatively determine this in vitro antimicótica activity of ethanolic and metanólico extracts on isolated antifungal samples and formulate a herbal capable of combating candidiasis. However, the results of the analyses were negative for the objective claimed, being able to be attributed to the geographical location of its harvest, the Brazilian Cerrado, with a view to the genetic and chemical variability that presents this species. It was possible to conclude that the result found in this study, however, opened up space for the realization of new research, since it ratified the influence of genetic and chemical variability of these plants according to their geographical distribution, and necessary analyses More specific to identify and characterize these differences in a more clear way, because there are still scarce research in the area.

Keywords: *Candida albicans*, Candidiasis, Medicinal Plants, Phytotherapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Crescimento das vendas de fitoterápicos nos anos (2013 – 2014).....	21
Figura 2: <i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit.....	24
Figura 3: <i>Hyptis mutabilis</i> (Rich.) Brig.....	26
Figura 4: <i>Hyptis suaveolens</i> e <i>Mutabilis</i> , respectivamente da esquerda para direita	33
Figura 5: Método de disco difusão.....	34
Figura 6: <i>Candida albicans</i> cultivada em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol por 48 horas.....	35
Figura 7: <i>Candida albicans</i> : leveduras com e sem brotamento e algumas pseudo- hifascoradas com Gram (aumento 1.000x).....	36
Figura 8: Colônias em tons de verde identificadas como <i>Candida albicans</i> em cultivo com o meio CHROMagar™ <i>Candida</i> (Difco – BD & CO).....	36
Figura 9: (<i>Hyptis suaveolens</i>) - Nenhum dos extratos apresentou inibição do crescimento das colônias de <i>Candida albicans</i> . Apenas o controle positivo, Itraconazol, apresentou halo de inibição de 21 mm de diâmetro.....	38
Figura 10: (<i>Hyptis mutabilis</i>) - Nenhum dos extratos apresentou inibição do crescimento das colônias de <i>Candida albicans</i> . Apenas o controle positivo, Itraconazol, apresentou halo de inibição de 21 mm de diâmetro.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

ABIFISA	Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentares e Promoção da Saúde
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CVV	Candidíase vulvovaginal
CVVR	Candidíase Vulvovaginal Recorrente
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
FE	Florestas Estacionais
OMS	Organização Mundial da Saúde
PTG	Prova do Tubo Germinativo
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SDD	Sensível Dose Dependente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 JUSTIFICATIVA.....	14
1.2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
1.2.1 Primeiras observações de microrganismos.....	15
1.2.2 Sobre a <i>Candida Albicans</i>	16
1.2.3 Aspectos gerais dos medicamentos fitoterápicos.....	18
Figura 1: Crescimento das vendas de fitoterápicos nos anos (2013 – 2014).....	21
1.2.4 <i>Hyptis suaveolens</i> (L) Poit.....	22
Figura 2: <i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit.....	24
1.2.5 <i>Hyptis mutabilis</i> (Rich.) Brig.....	26
Figura 3: <i>Hyptis mutabilis</i> (Rich.) Brig.....	26
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 MATERIAIS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO.....	28
3.1.1 Equipamentos.....	28
3.1.2 Vidraçarias.....	28
3.1.3 Materiais não descartáveis.....	29
3.1.4 Materiais descartáveis.....	29
3.1.5 Reagentes.....	29
4 MÉTODO.....	30
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS.....	30
4.2 MÉTODOS CLÁSSICOS.....	30
4.2.1 Recuperação dos Isolados Clínicos e identificação Fenotípica – Teste de Especificidade.....	30
4.2.2 Identificação Macroscópica e Microscópica – Teste de Especificidade.....	30
4.2.3 Prova do Tubo Germinativo (PTG): Meio Cromogênico - Teste de Especificidade. .	31
4.3 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DOS ISOLADOS CLÍNICOS.....	32
4.4 TESTE DE SENSIBILIDADE.....	32

4.5 COLETA E PREPARO DO MATERIAL BOTÂNICO.....	32
Figura 4: <i>Hyptis suaveolens</i> e <i>Mutabilis</i> , respectivamente da esquerda para direita.....	33
4.6 EXTRAÇÃO BOTÂNICA E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	33
4.7 PREPARAÇÃO DOS DISCOS.....	33
4.8 PREPARO DO INÓCULO FÚNGICO.....	34
4.9 MÉTODO DE DISCO DIFUSÃO.....	34
Figura 5: Método de disco difusão.....	34
4.10 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS POR MÉTODOS CLÁSSICOS – TESTE DE ESPECIFICIDADE.....	35
Figura 6: <i>Candida albicans</i> cultivada em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol por 48 horas.....	35
Figura 7: <i>Candida albicans</i> : leveduras com e sem brotamento e algumas pseudo-hifas coradas com Gram (aumento 1.000x).....	36
Figura 8: Colônias em tons de verde identificadas como <i>Candida albicans</i> em cultivo com o meio CHROMagar™ <i>Candida</i> (Difco – BD & CO).....	36
4.11 LEITURA E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DO EXPERIMENTO.....	37
5 RESULTADOS.....	37
5.1 DETERMINAR QUANTITATIVAMENTE A ATIVIDADE ANTIMICÓTICA <i>IN VITRO</i> DOS EXTRATOS ETANÓLICO E METANÓLICO SOBRE AMOSTRAS ANTIFÚNGICAS ISOLADAS ATRAVÉS DAS MEDIDAS DO CRESCIMENTO DO HALO DE INIBIÇÃO.....	37
Figura 9: (<i>Hyptis suaveolens</i>) - Nenhum dos extratos apresentou inibição do crescimento das colônias de <i>Candida albicans</i> . Apenas o controle positivo, Itraconazol, apresentou halo de inibição de 21 mm de diâmetro.....	38
Figura 10: (<i>Hyptis mutabilis</i>) - Nenhum dos extratos apresentou inibição do crescimento das colônias de <i>Candida albicans</i> . Apenas o controle positivo, Itraconazol, apresentou halo de inibição de 21 mm de diâmetro.....	38
6 DISCUSSÕES.....	39
7 CONCLUSÕES.....	42
REFERÊNCIAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

Buscas por novas formas para o tratamento de doenças têm sido de extrema importância e estudos sobre as propriedades terapêuticas de plantas medicinais vem sendo desenvolvidos pela comunidade científica (Ferreira et al., 2014).

Vários estudos são realizados em muitos países; e no Brasil, por possuir uma flora rica e variada, além da cultura da utilização destas plantas como antifúngicos, anti-inflamatórios, antibactericidas, entre outros, tem muito a contribuir nesse sentido (Ferreira et al., 2014).

A busca por medicamentos fitoterápicos tem crescido significativamente nos últimos anos, cada vez mais profissionais de saúde e pacientes estão conscientes dos benefícios trazidos por esses medicamentos, sendo oferecidos, inclusive, nas farmácias do Sistema Único de Saúde – SUS (Brasil, 2016).

As pesquisas sobre o uso de plantas medicinais e uso de fitoterápicos têm sido significativas nos últimos tempos, sendo intensificado seu uso no tratamento e cura de enfermidades, pois durante milênios a humanidade se utiliza de plantas medicinais para o tratamento, cura e prevenção de doenças, sendo este conhecimento passado de geração para geração, até se espalharem com o nascimento das civilizações modernas (Azevedo et al., 2014).

Conforme Glehn e Rodrigues (2012) referem em seu trabalho, à existência de tratados que evidenciam o uso de plantas medicinais na saúde humana com datas de 1700 a.C. Povos romanos, gregos, egípcios e chineses, possuem alguns desses tratados que incluem as descrições das plantas e sua utilização.

Badanai (2011) em seu estudo abordou que a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece o uso de práticas tradicionais pelas pessoas nos seus cuidados básicos de saúde, usando plantas ou preparações feitas com elas.

O gênero *Hyptis* é rico em espécies de grande importância econômica e etnofarmacológica. Dentre estas, a *Hyptis suaveolens* (L.) Poit e a *Hyptis mutabilis* (Rich.) Brig. foram eleitas para terem suas propriedades estudadas como um agente antifúngico no combate a *Candida albicans*, causadoras da candidíase, sendo a forma oral estudada aqui estudada, por serem enfermidades recorrentes e comuns na população em geral.

A *Hyptis suaveolens* (L.) Poit é conhecida popularmente como mentrasto, alfavacão, alfazema-de-caboclo, alfazema-brava, bamburral e erva canudo, sendo amplamente empregada na medicina popular. Trata-se de uma erva anual, com altura máxima de dois metros na fenofase de frutificação. São plantas alógamas¹, mas que em condições inadequadas para a troca de material genético, apresentam autopolinização como estratégia para seu desenvolvimento. Esta espécie é encontrada principalmente em regiões tropicais e subtropicais, e apresenta grande capacidade de adaptação, crescendo espontaneamente em ambientes abertos, sendo considerada como invasora de lavouras de milho e pastagens (Martins et al., 2006).

Destaca-se que algumas propriedades farmacológicas já foram confirmadas, tais como, bactericida, anticonvulsivante e fungicida, sendo a propriedade fungicida de interesse dessa pesquisa (Zoghbi et al., 2008).

A *Hyptis mutabilis* é conhecida popularmente como cheirosa e betônica-brava, da família Lamiaceae e gênero *Hyptis*, tem as mesmas características de crescimento e desenvolvimento que a *Hyptis suaveolens*. As propriedades encontradas citam o reparo de doenças da mucosa uterina, cervical, gastrite, úlcera gástrica, úlceras de pele infectadas e conjuntivite (Falcão; Menezes, 2003).

O quadro de candidíase oral é uma situação muito frequente e desagradável na vida das pessoas, porém observa-se que o número de infecções por cepas não *albicans* vem crescendo, sendo estas espécies mais resistentes aos agentes antimicóticos existentes (Gazeta Júnior et al., 2011).

Outro fator que tem contribuído para a dificuldade do tratamento da candidíase é o número limitado de terapias antifúngicas e a alta toxicidade por estas medicações. Neste sentido, estudos para o desenvolvimento de novas terapias advindas de produtos naturais têm surgido, com a intenção de obterem-se princípios

1 Plantas alógamas são aquelas que realizam preferencialmente polinização cruzada (acima de 95%). Neste caso, a fertilização ocorre quando o pólen de uma planta fertiliza o estigma da flor de outra planta. Nas alógamas, as plantas não transmitem seus genótipos para a geração seguinte como ocorre em espécies autógamias, mas sim os seus alelos. Portanto, a cada geração surgirão novos indivíduos que apresentarão constituição alélica diferentes dos seus pais. Nas alógamas, o que tem maior importância não é a constituição genética do indivíduo (genótipo), mas sim o conjunto gênico dessa população (pool gênico). Este é um grande desafio no melhoramento de alógamas, pois os genótipos superiores não são mantidos nos filhos, já que estes apresentarão segregação (Bespalhok; Guerra; Oliveira, 2007).

bioativos² para a produção de novos fármacos para o tratamento de diversas doenças (Abrantes et al., 2013).

De acordo com Freire et al. (2016), a candidíase é a infecção fúngica oportunista mais comum, atingindo principalmente pacientes imunologicamente comprometidos. Suas manifestações clínicas são variadas, podendo gerar desde uma infecção generalizada de mucosas até uma doença disseminada potencialmente fatal. Os autores destacam ainda que a preocupação com as infecções causadas pela *Candida* se volta para o aumento dessas infecções resistentes a antifúngicos, o que traz aumento do insucesso na terapêutica e, conseqüentemente, o crescimento da morbidade e da mortalidade.

A candidíase é uma doença causada por fungos do gênero *Cândida* sp., sendo a *Cândida albicans*, a causadora da maioria das infecções. Este fungo está presente em mucosas e pele de pessoas saudáveis (Brasil, 2010).

Podendo tornar-se prejudicial à saúde em situações que possam modificar os ambientes corpóreos (Glehn, 2012).

Nos últimos anos, a *Candida albicans* tem sido uma dos Patógenos mais frequentemente isolados em casos de infecção nosocomial, e esse aumento é devido à implementação de procedimentos invasivos e o uso de drogas imunossupressoras nos pacientes transplantados ou pacientes imunocomprometidos. Embora a presença de endocardite infecciosa causada por leveduras é rara, 67% desses casos resulta em um desfecho fatal na ausência de intervenção (Victorio et al., 2017).

Diante do exposto, salienta-se a necessidade de estudos voltados para a produção de novos fármacos contra as infecções causadas pela *Candida*, tendo neste estudo foco no tratamento fitoterápico, buscando responder ao seguinte questionamento: Qual a atividade antifúngica dos extratos brutos etanólicos e metanólico das propriedades da *Hyptis suaveolens* (L.) Poit e *Hyptis mutabilis* (Rich.) Brig. frente às cepas da *Candida albicans* *in vitro* isoladas?

Visando contribuir para a diversidade da terapêutica da sociedade acometida pela candidíase oral, este estudo pretende avaliar a atividade antifúngica da *Hyptis suaveolens* (L.) Poit e *Hyptis mutabilis* (Rich.) Brig. frente às cepas da *Candida Albicans* *in vitro* isoladas. A análise pretende quantificar a atividade do extrato bruto da *Hyptis suaveolens* (L.) Poit e *H. mutabilis* (Rich.) Brig. necessário para inibir o crescimento de fungos, particularmente a *Candida albicans*. Determinando

quantitativamente essa atividade antimicótica *in vitro* dos extratos etanólico e metanólico sobre amostras antifúngicas isoladas e formular um fitoterápico capaz de combater a Candidíase.

Dessa forma, a justificativa para seguir nessa pesquisa estaria na objetividade do critério custo-benefício (retorno econômico e sociais) que este estudo traz para sociedade em geral e científica com a formulação desse novo fitoterápico, principalmente para população que faz uso constante do SUS por questões sociais.

1.1 JUSTIFICATIVA

A *Candida albicans* é um fungo comum na população mundial, com características oportunistas no rebaixamento da imunidade dos seres humanos. A candidíase traz lesões importantes nas pessoas e podem ser fatais em alguns casos, como nas doenças imunodeprimidas. Por ser um fungo complexo na sua estrutura física, torna-se resistente a tratamentos com fármacos amplamente utilizados na medicina tradicional sendo de difícil tratamento. Diante desse cenário, a pesquisa pretende formular um fitoterápico capaz de combater a candidíase nas suas diversas formas, inclusive a oral. Uma vez que a diversidade da flora brasileira é uma das mais ricas fontes de novas substâncias bioativas, se configurando como uma valiosa ferramenta no estudo e exploração de seus recursos.

Essa droga pretendida trará a população muitos benefícios sociais, visto que é uma doença amplamente difundida na população em geral sem distinção, podendo ter desfecho fatal na ausência de intervenção. Outro ponto positivo desse novo fármaco perpassa o lado econômico, podendo ser obtido de forma mais acessível do que os fármacos antifúngicos rotineiramente utilizados na medicina tradicional, com a mesma qualidade no combate a doença e sem muitos efeitos colaterais por ser um fitoterápico de extratos vegetais. Sendo um avanço em termos de medicação para a população em geral e para todos os profissionais da saúde. Justificando assim, a realização deste trabalho que busca contribuir com novos dados para a literatura científica, além de visar à obtenção de um produto fitoterápico eficaz contra a Candidíase.

1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

1.2.1 Primeiras observações de microrganismos

Conforme Lopes, Guimarães e Pupo (2011) falam sobre a história dos microrganismos, pois remete à história da própria humanidade, visto que de acordo com os estudos relacionados ao assunto, eles sempre estiverem presentes no planeta Terra.

Os autores conceituam ainda que microrganismos são organismos minúsculos representados por fungos, bactérias, vírus, algas e protozoários. Em sua maioria, não se locomovem e não possuem mecanismos de defesa, podendo ser encontrados em toda a parte, no solo, na água, nas pedras, na superfície de seres vivos, entre outros (Lopes et al., 2011)

Para Manfio (2000) o termo microrganismo consiste em uma definição operacional para designar os táxons de organismos unicelulares microscópicos que vivem na natureza de forma isolada ou em agregados celulares. De acordo com o autor, os microrganismos foram os primeiros a habitar o planeta Terra, estimando-se que os primeiros surgiram há mais de 3,5 milhões de anos, sendo sua ação metabólica a responsável pelo surgimento de novas formas de vida, visto que resultou na formação de uma atmosfera rica em oxigênio.

Bossolon (2002) afirma que os principais grupos de microrganismos são os protozoários, os fungos, as algas e as bactérias, e ainda, os vírus, que apesar de não serem considerados seres vivos, são estudados como microrganismos.

Observando essas nomenclaturas é fácil associar microrganismos a patologias, visto que sempre escutamos falar em vírus, bactérias e fungos como causadores de doenças, porém, é válido ressaltar que existem microrganismos essenciais à vida, como por exemplo, aqueles que participam da fotossíntese oxigênica (Bossolan, 2002).

A descoberta dos primeiros microrganismos se deu por volta do ano de 1600, quando o alemão Zacharias Jannsen construiu o primeiro microscópio, visto que Antony Van Leeuwenhoek fez suas primeiras observações utilizando o instrumento e descreveu detalhadamente o que viu (Verjovsky et al., 2007).

Todavia, nessa época nada se comprovou acerca da ligação dos microrganismos com as doenças, sendo o primeiro a comprovar esse fato o italiano Agostino Bassi, que descobriu os fungos que contaminavam os bichos-da-seda. Os estudos

avançados acerca do assunto só vieram a se intensificar no século XIX, surgindo nesse período dois importantes estudiosos dos microrganismos: o químico francês Louis Pasteur e o médico e microbiologista alemão Robert Koch (Verjovsky et al., 2007).

Esses dois estudiosos, apesar de divergirem em suas opiniões apresentam-se como fundamentais no estudo dos microrganismos, visto que foram responsáveis por determinar o papel específico dos micróbios nas doenças, bem como desenvolveram vacinas para combater esses microrganismos (Verjovsky et al., 2007).

No caso dos estudos voltados para a ação dos microrganismos sobre as doenças, inúmeros foram os estudos realizados com vistas a entender o processo e combatê-los em seguida. Um dos primeiros métodos adotados para o combate aos microrganismos antes que eles entrassem no organismo humano ou animal foi criado por Louis Pasteur, método este que hoje é conhecido como pasteurização, sendo amplamente utilizado para comercialização do leite, que consiste na eliminação dos micróbios por meio do calor, o qual não deveria ser tão quente que viesse a prejudicar o alimento, mas suficiente para tornar os germes inócuos (Bossolan, 2002).

A comprovação de que as doenças eram ocasionadas pela ação de microrganismos veio com os estudos realizados por Robert Koch, que estabeleceu quatro postulados nesse sentido, os quais Bossolan (2002, p. 7) especificou:

- 1) Um microrganismo específico pode sempre ser encontrado em associação com uma dada doença;
- 2) O organismo pode ser isolado e cultivado, em cultura pura, no laboratório;
- 3) A cultura pura produzirá a doença quando inoculada em animal sensível;
- 4) É possível recuperar o microrganismo, em cultura pura, dos animais experimentalmente infectados.

Conforme destacam Lopes, Guimarães e Pupo (2011) com seus inúmeros estudos, no decorrer do tempo o homem conseguiu trazer os microrganismos para dentro dos laboratórios, cultivando-os, isolando-os e os identificando quimicamente, de forma a aplicá-los na medicina como medicamentos.

1.2.2 Sobre a *Candida Albicans*

A *Candida albicans* causa a maioria das infecções, a Candidíase, como é definida no Caderno de Atenção Básica (2002), nele diz que uma micose que atinge

a superfície cutânea ou membranas mucosas, resultando em candidíase oral, candidíase vulvo vaginal (CVV), intertrigo³, paroníquia⁴ e onicomicose⁵.

Andreola et al. (2016), referem que a Candidíase é a infecção fúngica mais comum da cavidade bucal. Entre as espécies pertencentes ao gênero *Candida*, a *Candida albicans* é considerada como uma das mais patogênicas, bem como a espécie de maior importância odontológica, sendo que sua ocorrência neste sítio anatômico representa 20% a 60% de todos os isolados. A forma mais comum de candidíase oral é a pseudomembranosa, caracterizada por placas brancas removíveis na mucosa oral.

Assim, apresenta-se como um dos agentes patógenos mais importantes encontrados na cavidade oral. E que clinicamente, o gênero *Candida* é o agente causador de diferentes tipos de infecções na cavidade bucal. Portanto, as manifestações clínicas da candidíase oral variam de agudas (pseudomembranosa e eritematosa) a crônicas (pseudomembranosa, eritematosa e hiperplásica). A queilite angular, a estomatite associada à prótese, bem como a glossite romboidal mediana, são consideradas formas menos frequentes da infecção (Andreola et al., 2016).

Naturalmente, a *Candida* está presente na pele e mucosas de pessoas saudáveis. Infecção mucocutânea leve é comum em crianças saudáveis e a doença invasiva ocorre em pessoas imunodeprimidas. Vulvovaginite por *Candida* ocorre com frequência em gestantes, podendo ser transmitida ao recém-nascido em útero, durante o parto ou na fase pós-natal (Brasil, 2002).

Outra forma de apresentação é o intertrigo, atinge mais frequentemente as dobras cutâneas, nuca, virilhas, regiões axilares, inframamária e interdigitais. Nas crianças, a irritação e maceração da pele, provocada pela urina e pelas fezes na área das fraldas, favorecem o desenvolvimento da levedura que provoca eritema intenso nas áreas de dobras cutâneas, com lesões eritemato-vésico-pustulosas na periferia (lesões satélites) (Brasil, 2002).

3 Alteração da pele que ocorre em áreas de dobras cutâneas, como axilas, virilhas e espaços entre os dedos, principalmente dos pés. A pele elimina água constantemente, de forma imperceptível, que evapora imediatamente, fenômeno conhecido como perspiração. Nestas regiões, o vapor d'água fica retido, umedecendo e amolecendo a pele.

4 Conhecida popularmente como unheiro, é a inflamação da dobra ungueal (pele ao redor da unha) e pode ser provocada por diversos agentes como bactérias, fungos e vírus.

5 Infecção nas unhas, causada por fungos, que se alimentam da queratina, proteína que forma a maior parte das unhas. As unhas dos pés são as mais afetadas por enfrentarem ambientes úmidos, escuros e quentes com maior frequência do que as mãos. Esse ambiente é considerado ideal para o crescimento dos fungos.

A infecção da unha (onicomicoses e paroníquia) caracteriza-se por eritema e edema das dobras das unhas seguidas de distrofia ungueal e onicólise. Pode ocorrer infecção secundária levando a paroníquia mista caracterizada pela presença de secreção purulenta (Brasil, 2002).

As atividades com imersão frequente em água e diabetes são fatores predisponentes nesse tipo de candidíase. A infecção mucocutânea crônica pode estar associada com doenças endócrinas, como diabetes melittus, tratamento com antibióticos de amplo espectro ou imunodeficiência, sendo frequente na infecção por HIV. Candidíase disseminada ocorre em recém-nascidos de baixo peso e hospedeiros imunocomprometidos, podendo atingir qualquer órgão e evoluir para óbito. A disseminação hematogênica pode ocorrer em pacientes neutropênicos, conseqüente ao uso de sondas gástricas ou cateteres intravasculares, atingindo diversos órgãos ou prótese valvular cardíaca (Brasil,2002).

Estudos em diferentes regiões do Brasil sugerem que fatores geográficos interferem na prevalência das espécies de *Candida*, bem como na sensibilidade dos isolados para antifúngicos (Brandolt et al. 2017).

O modo de transmissão dar-se pelo atrito, calor e a umidade que facilitam o desenvolvimento do fungo já existente nas mucosas ou pele. O contato com secreções originadas da boca, pele, vagina e dejetos de portadores ou doentes. A transmissão vertical dá-se da mãe para o recém-nascido, durante o parto. Pode ocorrer disseminação endógena (Brasil, 2002).

1.2.3 Aspectos gerais dos medicamentos fitoterápicos

Abranches (2015) diz que a fitoterapia consiste na terapêutica que tem como princípio ativo plantas medicinais, se configurando como a forma antiga de tratamento medicamentoso. Assim, entende-se por medicamentos fitoterápicos aqueles que são produzidos a partir de plantas.

Ainda de acordo com Abranches (2015), a Fitoterapia consiste em uma ciência já consolidada, tendo em vista que tem como base conhecimentos de fisiologia, fisiopatologia, farmacologia, química orgânica, bioquímica e outras áreas da saúde.

Fernandes (2004, p. 14) conceitua fitoterápicos como aqueles que “são originados exclusivamente de material botânico integral ou seus extratos, usado com o

propósito de tratamento médico”. O autor ainda destaca que para transformar uma planta em um produto destinado à saúde é necessário um trabalho multidisciplinar envolvendo profissionais como biólogos, botânicos, farmacêuticos, químicos, médicos e agrônomos.

Na legislação brasileira, os medicamentos fitoterápicos estão regulamentados pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n. 14/2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que assim resolve em seu artigo 1º:

§ 1º São considerados medicamentos fitoterápicos os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas.

§ 2º Os medicamentos fitoterápicos são caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade.

§ 3º Não se considera medicamento fitoterápico aquele que inclui na sua composição substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, nem as associações dessas com extratos vegetais.

Silva (2013) destaca que a qualidade dos produtos farmacêuticos pode ser afetada por inúmeros fatores como temperatura, luz e umidade e, ainda, fatores relacionados ao próprio produto como as suas propriedades físicas e químicas do fármaco e dos excipientes, do material de acondicionamento e do material de embalagem.

No campo dos medicamentos fitoterápicos esse fator não é diferente, assim como nos medicamentos sintéticos se faz fundamental que a qualidade seja mantida, tendo em vista que esses produtos são direcionados para a promoção da saúde (Silva, 2013).

Se o produto fitoterápico ou a droga vegetal tiver má qualidade poderá comprometer a sua eficácia, podendo oferecer riscos à saúde do consumidor. A autora destaca ainda que é importante garantir a qualidade do material vegetal por meio de seus aspectos botânicos, químicos e farmacológicos (Badanai, 2011).

Souza e Maciel (2010) acrescentam que os fitoterápicos são medicamentos que apresentam como princípio-ativo, drogas e extratos exclusivamente vegetais. A bactéria *Escherichia coli* tem grande prevalência em amostras de fitoterápicos, causando infecções gastrointestinais, urinárias e respiratórias, sendo, portanto, importante um maior rigor nos testes de qualidade para que se minimize possíveis contaminações.

Concluíram os autores que devem os medicamentos fitoterápicos ser considerados com o mesmo rigor que os medicamentos sintéticos.

Santos et al. (2015) analisaram a espécie *Calendula officinalis* L. que é uma planta herbácea pertencente à família Asteraceae, suas flores apresentam propriedades antimicrobianas, emolientes, anti-inflamatórias e tonificantes da pele. Tiveram o objetivo de avaliar a identidade e qualidade de seis amostras de flores de *C. officinalis* L. comercializadas na Grande Curitiba (PR).

Ainda na pesquisa de Santos et al. (2015), realizaram ensaios de identificação macroscópica e de pureza, determinação de flavonoides, perfil do extrato etanólico em cromatografia em camada delgada, avaliação das atividades antioxidante e atividade antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Verificaram que a má qualidade de plantas medicinais, pode ocasionar ausência do efeito terapêutico esperado, além de possíveis efeitos tóxicos.

Montes et al. (2017) mencionaram que seu estudo que as plantas medicinais apresentam destaque na terapêutica popular, no entanto podem representar risco em potencial para a saúde, se for de uso indiscriminado, com identificação botânica errônea, más condições de armazenamento, dentre outros.

Com isso, os autores objetivaram analisar a qualidade biológica das matérias primas vegetais utilizadas na fitoterapia popular. Buscaram realizar a contagem e identificação de possíveis patógenos microbianos para determinação da qualidade microbiológica. Os resultados mostraram que a maioria das drogas vegetais analisada apresentou carga microbiana acima do que se preconiza a quinta edição da Farmacopeia Brasileira (Montes et al. 2017);

Silva (2007) explica que no Brasil existe um comércio de plantas medicinais e de produtos fitoterápicos em expansão pelo alto custo dos medicamentos industrializados. No entanto, tem sido comum o comércio de amostras de má qualidade e sem atividade terapêutica comprovada. Deste modo, analisou amostras de flores de Camomila, comercializadas na cidade de Maringá (PR).

Os resultados mostraram que 100% das amostras apresentaram-se como capítulos florais de *Matricaria recutita*, no entanto, em 14,3% das amostras foi verificada a presença de insetos. A presença de óleo essencial foi detectada em apenas 50% do material analisado e a perda por dessecação das amostras encontraram-se dentro dos limites permitidos (Silva et al., 2007).

Em outra pesquisa, os autores descreveram a análise microbiológica de amostras do fitoterápico *Ginkgo biloba* obtidas de seis farmácias do município de Votuporanga/SP. Tiveram como objetivo em seu estudo verificar a carga microbiológica do fitoterápico, pela técnica de Contagem de Unidades Formadoras de Colônia em placa de Petri, segundo metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira IV, indicada para determinação do número total de bactérias e fungos presentes em produtos manufaturados e matérias-primas não estéreis. Concluíram os autores que das amostras analisadas, apenas uma teve contagem de carga bacteriana for a dos limites estabelecidos que é de 103 UFC/g ou ml (Tamada et al.,2011).

Turolla e Nascimento (2006) avaliaram a disponibilidade de dados e fontes públicas de informação, sobre a toxicidade pré-clínica de dez plantas medicinais comercializadas na forma de medicamentos fitoterápicos no Brasil. Os autores constataram que há poucos dados sobre a toxicidade pré-clínica das dez plantas pesquisadas, mas, de maneira geral, os experimentos em animais demonstraram baixa toxicidade aguda, subaguda e crônica e não mostraram atividades mutagênicas ou teratogênicas.

Para que se tenha melhor noção sobre o crescimento do mercado de fitoterápicos no Brasil, a Figura 1 apresenta os resultados em vendas nos anos de 2013 e 2014.

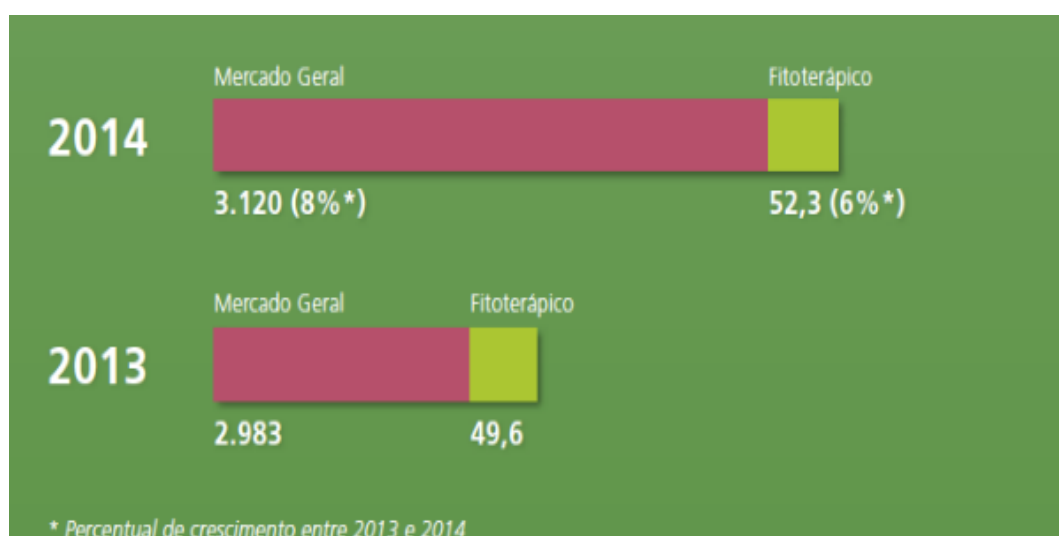


Figura 1: Crescimento das vendas de fitoterápicos nos anos (2013 – 2014)
Fonte: <http://www.abifisa.org.br/noticias>

Como justificativa, Freitas et al. (2010, p. 01) afirmam que o crescimento se dá: “nos países desenvolvidos, como alternativa mais saudável, ou menos danosa,

de tratamento. Em países em desenvolvimento, como resultante do não acesso aos medicamentos farmoquímicos”. Assim, o mercado está cada vez mais aquecido, destacando a busca por terapêutica natural, por um tratamento medicamentoso que se reflita como menor química no organismo.

Segundo dados do Ministério da Saúde do Brasil, o crescimento pelo uso de fitoterápicos entre 2013 e 2015 pelo SUS foi de 161%, destacando a importância desse crescimento pelo custo reduzido desses medicamentos, sendo fundamental que o acesso a eles seja ampliado. Conforme (BRASIL, 2016, p. 1):

Os fitoterápicos mais utilizados na rede pública são o guaco, a espinheira-santa e a isoflavona-de-soja, indicados como coadjuvantes no tratamento de problemas respiratórios, gastrite e úlcera e sintomas do climatério, respectivamente. Todos esses produtos são testados para verificação da eficácia e dos riscos de seu uso e também para garantir a qualidade do insumo.

Desse modo, verifica-se que o crescimento do mercado de fitoterápicos no Brasil tem crescido não somente na saúde privada, mas também no âmbito da saúde pública.

Importante mencionar a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos criada no ano de 2006, tendo como objetivo: garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (Brasil, 2006).

Todavia, se faz necessário destacar que apesar de serem derivados de plantas medicinais, esses medicamentos também representam riscos à saúde, portanto, se faz necessária vigilância para que o uso racional deste tipo de medicamento também seja promovido e as pessoas conscientizadas dos perigos que significam.

1.2.4 *Hyptis suaveolens* (L) Poit

O uso de plantas medicinais tem sido largamente empregado no tratamento e prevenção de doenças pela população nos últimos anos. Durante milênios os povos indígenas de todo mundo vêm utilizando plantas com fins medicinais e estes conhecimentos foram transmitidos por gerações até se difundirem com o surgimento das civilizações modernas (Rezende et al, 2004).

Quando os primeiros europeus chegaram ao Brasil visualizaram de imediato grande quantidade de espécies medicinais empregadas por povos indígenas, e nessa troca de culturas que houve profundo envolvimento com a flora local e seu poder curativo, e os saberes trazidos da Europa e da África, principalmente, por escravos africanos (Gois et al, 2016).

Ainda segundo Gois (2016), informações sobre plantas, pessoas e cultura, associado a um registro experimental de uso, com comprovado efeito biológico são analisadas e estudadas por disciplinas como a etnobotânica e a etnofarmacologia.

Silva (2015) diz que o conhecimento repassado de geração a geração nas comunidades tradicionais, sobre os recursos terapêuticos das plantas encontradas em seu ambiente natural pode ser um instrumento importante, como por exemplo, para indústria farmacêutica na elaboração de novos medicamentos.

Pelo grande interesse medicinal e comercial, a comunidade científica mundial vem trabalhando no intuito de comprovar o uso popular de plantas medicinais, contribuindo assim para o uso seguro e a descoberta de novos fármacos (Azevedo et al., 2014).

No que diz respeito à *Hyptis suaveolens*, Arruda (2015, p. 17) a descreve em parte de sua Dissertação de Mestrado que:

Mais da metade das espécies dessa família está restrita a somente 8 gêneros: *Salvia* (500), *Hyptis* (350), *Scutellaria*, *Coleus*, *Plectanthis* e *Stachys* (com 200 espécies cada), além de *Nepeta* (150) e *Teucrium* (100). Entre esses gêneros destaca-se o *Hyptis*, pertencente à tribo *Ocimae*, subtribo *Hyptidinae*, família *Lamiaceae*, com cerca de 400 espécies, com ampla distribuição no continente americano. São plantas conhecidas por apresentar espécies de grande importância econômica e etnofarmacológica e possuem grande diversidade na forma vegetativa, desde anual efêmera (*Hyptis nudicaulis* Benth) até árvores pequenas (*Hyptis arborea*), mas há uma predominância de subarbustos ou ervas perenes.

Arruda (2015), mostra que entre as espécies que compõe esse gênero, destaca-se *Hyptis suaveolens* (L.) *Poit*, nativa de todo continente americano, distribuída nas regiões tropicais e subtropicais.

Ainda em seu trabalho, Arruda (2015) relata que no Brasil, a distribuição *H. suaveolens* ocorre em todo o território nacional, sendo frequentemente encontrada

em locais que foram submetidas à ação antrópica⁶ como 18 pastagens, culturas anuais e perenes.

A espécie (Figura 2) é anual, subarborescente, com altura que varia de 0,50 a 1,90 m, podendo atingir até 3m dependendo do ambiente onde se encontra e é conhecida vulgarmente como bamburral, sambacoité, mentrasto-do-grande, cheirosa, alfavacão, alfavaca-de-caboclo, alfazema-decaboclo, alfazema-brava, salva-limão, betônica-brava, metrasto-graçú, são-pedro-caá, melissade-pison, pataquera, betônia-branca e chá-de-frança (Lorenzi; Matto, 2002).



Figura 2: *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.
Fonte: www.kew.org

A *Hyptis suaveolens* representa uma importante fonte de óleos essenciais, alcalóides, flavonóides, fenóis, saponinas, terpenos e esteróis. O conteúdo e o tipo de compostos fenólicos encontrados nos óleos essenciais e extratos dessas espécies estão entre os fatores que determinam sua atividade biológica (Tesch et al. 2015).

6 Ações antrópicas são as alterações realizadas pelo homem no planeta Terra. A ação antrópica na natureza sempre aconteceu, desde os tempos antigos até hoje em dia. Pois sempre quando utilizamos algo do meio ambiente, o alteramos de alguma maneira. Hoje principalmente, a ação antrópica em relação à natureza é bastante preocupante, pois por conta do aumento populacional estas ações estão sendo realizadas com uma frequência muito maior, e nem sempre de uma maneira responsável e sustentável, causando danos à fauna e flora em geral, acabando por levar à extinção plantas e animais, e por vezes, elevando a população de espécies prejudiciais, como mosquitos transmissores de doenças por exemplo.

As espécies do *Hyptis* do gênero Lamiaceae são utilizados em aplicações como repelentes e inseticidas, também quanto à antinociceptivo, anti-hiperglicêmico, antifúngico, antibacteriano, propósitos antiinflamatórios, antimaláricos e gastrointestinais, são descritos em seu recente trabalho. As espécies de Lamiaceae, referência neste trabalho, são culturalmente importantes e têm potencial para tratar diferentes doenças. Estudos de suas atividades terapêuticas podem ser usados para explicar as atividades biológicas que foram relatadas (Tafurt-García, 2015).

Ngozi et al. (2014) também afirma que essa planta é utilizada como antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antidiarreica, antiparasitária, antidiabética, anticancerígena, cicatrizante e inseticida. Trata-se de uma planta nativa, não endêmica, que se encontra distribuída em todas as regiões do Brasil.

Sobre o florescimento dessa planta, Martins e Polo (2009, p. 140) destacam ser afetado por fatores ambientais, principalmente pela temperatura e pelo fotoperíodo e em sua pesquisa verificaram que:

Hyptis suaveolens é uma planta de dias curtos, com fotoperíodo crítico oscilando próximo a 13 h. Esta espécie não sofre transição para floração e o meristema floral não apresenta a organização típica de um ápice vegetativo. A atividade meristemática, de um meristema aéreo vegetativo ou floral, pode ser claramente evidenciada através da densidade celular.

Ressalta-se que essa influência dos fatores ambientais no teor e composição do óleo essencial.

Sobre o assunto, Martins et al. (2006) mencionam que o óleo essencial da *Hyptis suaveolens* possui elevada variabilidade na composição e no teor dos constituintes majoritários, sendo esta variabilidade determinada pela origem geográfica das plantas.

Com isso, de acordo com os autores, a procedência da planta pode ser um fator de variabilidade genética, o que pode ser justificado pelo fato da biodiversidade envolver o metabolismo das plantas e seus produtos (Martins et al.,2006).

Os resultados de sua pesquisa demonstraram que a idade da planta, inteirada com a disponibilidade nutricional, constitui o fator de variação mais significativo para a composição do óleo, porém, as variáveis ambientais não apresentaram tantas influências (Martins et al.,2006).

Azevedo et al. (2002) elucidam que a latitude é o principal fator ambiental que influencia na composição do óleo essencial de *Hyptis suaveolens*, sendo os

sesquiterpenos produzidos em latitudes mais baixas e os monoterpenos em latitudes mais altas.

Ainda de acordo com Azevedo (2002), os autores analisaram em sua pesquisa 11 populações de *Hyptis suaveolens* do Cerrado brasileiro, verificando com principais constituintes: sabinene, limoneno, bicyclogermacrene, β -phellandrene e 1,8-eucaliptol.

Diante da importância de avaliar a ação farmacológica de drogas vegetais, como é o caso da espécie em questão, e ainda, considerando a importância do vasto potencial farmacológico, o presente estudo visou investigar preliminarmente a ação antifúngica do extrato bruto da *Hyptis suaveolens* e *H. mutabilis* contra cepas de *Candidas Albicans*, com o propósito de dar continuidade aos estudos da atividade terapêutica desta planta.

1.2.5 *Hyptis mutabilis* (Rich.) Brig

A *Hyptis mutabilis* (Figura 3) é conhecida popularmente como cheirosa e betônica-brava, da família Lamiaceae e gênero *Hyptis*, tem as mesmas características de crescimento e desenvolvimento como a *Hyptis suaveolens*. As propriedades encontradas citam o reparo de doenças da mucosa uterina, cervical, gastrite, úlcera gástrica, úlceras de pele infectadas e conjuntivite (Falcão; Menezes, 2003)



Figura 3: *Hyptis mutabilis* (Rich.) Brig
Fonte: Dados primários da pesquisa

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se há atividade antifúngica dos extratos vegetais e em caso de positividade, quantificar e qualificar a atividade das propriedades do extrato bruto da *Hyptis suaveolens* (L.) *poit* e *Hyptis mutabilis* (Rich.) *Brig.* sobre a *Candida albicans* com objetivo de formular um fármaco capaz de combater a candidíase.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar *in vitro* a atividade antifúngica das propriedades dos extratos vegetais etanólicos e metanólicos da *Hyptis suaveolens* (L.) *Poit* frente às cepas de *Candida albicans* isoladas.
- Verificar *in vitro* a atividade antifúngica das propriedades dos extratos vegetais etanólicos e metanólicos da *Hyptis mutabilis* (Rich.) *Brig.* frente às cepas de *Candida albicans* isoladas.
- Determinar quantitativamente a atividade antimicótica *in vitro* dos extratos etanólico e metanólico sobre amostras antifúngicas isoladas através das medidas do crescimento dos halos de inibição.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta é uma pesquisa de caráter experimental e foi realizada em laboratório com uma coleção de cultivos fúngicos, sendo realizados testes de sensibilidade e especificidade, pois é necessário isolamento apenas das cepas da *Candida albicans*.

Operacionalmente o estudo realizado foi dividido em etapas para que fosse possível o alcance dos resultados de forma concreta, acreditando-se que percorrer três etapas foi fundamental para tanto. O esquema operacional das etapas deste estudo foi: coleta e análise dos dados, definição do processo de coleta de dados, definição da metodologia.

A partir dessas etapas definiu-se a análise de isolados clínicos com métodos clássicos (testes de especificidade) para identificação fenotípica como a análise microscópica e macroscópica e prova de tubo germinativo. E testes de sensibilidade com extratos vegetais. O método de disco-difusão também foi utilizado para análise das amostras. Os materiais e métodos utilizados estão melhor detalhados nos tópicos a seguir.

3.1 MATERIAIS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO

3.1.1 Equipamentos

Autoclave, balança analítica, Banho-maria, Bico de Bunsen, Bomba a vácuo, Câmara de fluxo laminar, Deionizador de água, estufa microbiológica, Medidor de pH (phametro), pipeta automática, Vórtex, Paquímetro, Freezer -20.

3.1.2 Vidraçarias

Béquer, Erlenmeyer, Pipeta graduada 10 mL, Pipeta Pasteur, Proveta, Placas de Petri 90 x 15 , Tubos de ensaio 18 x 180

3.1.3 Materiais não descartáveis

Colheres de pesagem, Caneta Pilot, Estante para tubos de ensaio, Eppendorffs, Espátula de aço inoxidável, Alça de platina, Ponteiras, Recipientes de pesagem, Solução de MacFarland padrão 0,5

3.1.4 Materiais descartáveis

Fita adesiva, Filme de PVC, Gaze, Luvas, Máscaras, Swabs

3.1.5 Reagentes

Ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol – ACUMEDIA®, CHROMagar DIFCO®, Água destilada, Água deionizada, Álcool 70% GL, Itraconazol - Prati Donaduzzi®, DMSO (dimetilsulfóxido) VETEC®, Cloreto de sódio VETEC®.

4 MÉTODO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS

A Coleção de Cultivos Fúngicos pertencente ao Laboratório de Micologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. O período de incubação para o cultivo de materiais biológicos associados à micose sistêmica foi de 15 dias, no entanto, o crescimento de leveduras foi observado, em média, até 72 horas (Larone, 1995) após a sementeira.

Os isolados clínicos foram conservados em água destilada estéril em tubos de microcentrifugação de 2,0 ml à temperatura de 20°C negativo, para recuperação e processamento posterior, conforme recomendação de conservação (Neufeld, 1999).

4.2 MÉTODOS CLÁSSICOS

4.2.1 Recuperação dos Isolados Clínicos e identificação Fenotípica – Teste de Especificidade

Para a identificação fenotípica, os isolados clínicos foram subcultivados em tubos de ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (NEOGEN Corporation, Michigan, USA) a 35°C (\pm 2°C) por 24 a 48 horas, até que ocorresse crescimento adequado (Larone, 1995).

O cloranfenicol foi utilizado para que não houvesse crescimento bacteriano, a fim de especificar apenas cultivos fúngicos de cepas de *Candida albicans*.

A partir de colônias frescas e puras, foram observadas as características macroscópicas e microscópicas e realizadas a prova do tubo germinativo (PTG) e a identificação presuntiva em meio cromogênico.

4.2.2 Identificação Macroscópica e Microscópica – Teste de Especificidade

A identificação macroscópica foi realizada a partir da visualização das colônias em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (NEOGEN Corporation,

Michigan, USA) em placas de Petri, após 48 horas de incubação a 35°C e para a identificação microscópica, amostras de uma a duas colônias foram utilizadas para o preparo de lâminas submetidas à coloração de Gram. As preparações foram observadas ao microscópio óptico com aumento de 1.000X, a fim de visualizar e caracterizar as estruturas leveduriformes (Larone, 1995).

4.2.3 Prova do Tubo Germinativo (PTG): Meio Cromogênico⁷ - Teste de Especificidade

O meio cromogênico (CHROMagar Candida-DIFCO, Becton Dickinson & Co, Sparks, Mariland, USA) em placas foi utilizado para identificar, de forma presuntiva, *Candida albicans*, e outras espécies de *Candida* que pudessem estar presentes nos cultivos dos materiais clínicos. As espécies de *Candida* produzem colônias de diferentes cores ao reagirem com os substratos cromogênicos presentes no meio.

As colônias de *Candida albicans* aparecem com coloração verde clara a verde médio, as colônias de *Candida tropicalis* são azul-esverdeadas a azul metalizadas, com ou sem halo violeta, e as colônias de *Candida krusei* são cor de rosa claro a vermelho claro com rebordo esbranquiçado.

A presença de colônias com outras colorações é atribuída a outras espécies de leveduras do gênero *Candida* como: *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Candida famata*, *Candida glabrata*, entre outras. No entanto, estas espécies não foram identificadas por este método (Odds; Bernaerts, 1994).

O uso do meio cromogênico para identificação de *Candida* spp. seguiu os seguintes passos: inicialmente, foi preparado o inóculo fúngico com turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland (1 x 10⁶ a 5 x 10⁶ células/ml) em tubos de ensaio contendo 3,0mL de solução salina estéril a 0,85%. O inóculo foi espalhado no meio de cultura com auxílio de alça de inoculação e, em seguida, o meio foi incubado a 35°C (± 2°C) por 48 horas. Após período de incubação, as placas foram submetidas à leitura visual, a fim de detectar a presença de colônias de coloração específica para as espécies de *Candida*. Como controle positivo foram utilizadas

7 Meio cromogênico é um meio de cultura destinado ao isolamento seletivo e diferencial de espécies de *Candida* de importância clínica.

cepas de referência de *Candida albicans* ATCC 20735, *Candida krusei* ATCC 14243, *Candida tropicalis* ATCC 750.

4.3 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DOS ISOLADOS CLÍNICOS

O perfil de susceptibilidade dos isolados clínicos de *Candida* spp. foi realizado pelo método de disco difusão de acordo com o documento M44-A do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) dos Estados Unidos da América (CLSI, 2004).

4.4 TESTE DE SENSIBILIDADE

Verificar *In Vitro* a Atividade Antifúngica das Propriedades dos Extratos Vegetais Etanólicos e Metanólicos da *Hyptis Suaveolens* (L.) Poit e *Hyptis Mutabilis* Frente às Cepas de *Candida Albicans* Isoladas.

4.5 COLETA E PREPARO DO MATERIAL BOTÂNICO

Partes das plantas (folhas, flores e ramos) de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. de *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq., gênero *Hyptis*, família *Lamiaceae*, (voucher 1228/UFMS) foram coletadas na região do Cerrado no entorno de Três Lagoas, que se configura como um município brasileiro da região Centro-Oeste, localizado no estado de Mato Grosso do Sul.

A cidade de Três Lagoas (MS) está inserida no Cerrado Brasileiro e possui um conjunto fitogeográfico uniforme, uma vez que apresenta em sua paisagem campos limpos, e florestas perenifólias, subperenifólias e mesofólias. A vegetação predominante é o Cerrado (gramíneo lenhosa, arbórea densa e arbórea aberta). Há também faixas de Mata Atlântica, que se alternam perpendicularmente às margens do Rio Paraná com a vegetação do Cerrado, até que estas listras de floresta se afinam e desaparecem conforme se distanciam do rio.

As plantas colhidas foram identificadas e depositadas em exsicata, no Herbário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campus de Três Lagoas (MS).

A Figura 4 apresenta o tipo de material botânico utilizado nesta pesquisa, *Hyptis suaveolens* e *mutabilis*, colhidas na região da Cascalheira, às margens do Rio Paraná e também do local (Cascalheira mostrando o aspecto florístico da área que é de preservação ambiental do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente - IBAMA).



Figura 4: *Hyptis suaveolens* e *Mutabilis*, respectivamente da esquerda para direita
Fonte: Dados primários da pesquisa

4.6 EXTRAÇÃO BOTÂNICA E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Para a obtenção dos extratos, o material botânico foi seco em estufa de ar circulante a 45° e pulverizadas em moinho de facas. Os extratos etanólico e metanólico foram obtidos por maceração, por três vezes, durante sete dias cada um. Primeiro, o material botânico pulverizado (40g) foi embebido no metanol (2L) e macerado à temperatura ambiente. A remoção dos solventes foi realizada em rota evaporador com pressão reduzida e à temperatura de 45°C. Com o material restante, o mesmo procedimento foi realizado, utilizando etanol a 95% (Souza et al., 2012).

4.7 PREPARAÇÃO DOS DISCOS

Na preparação dos discos, 250mg dos extratos metanólico e etanólico, foram solubilizados com 1ml de DMSO obtendo soluções estoques com concentração de

250mg/ml. Em seguida, 25µL da solução estoque foi adicionada em discos de papel de filtro de 6 mm de diâmetro, que foram submetidos à temperatura ambiente, durante 24 horas, para secagem. O DMSO foi utilizado como controle negativo.

4.8 PREPARO DO INÓCULO FÚNGICO

A partir de subcultivos dos isolados clínicos de *Candida* spp., em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (NEOGEN Corporation, Michigan, USA) a 35°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) por 24 a 48 horas, foram preparados inóculos fúngicos. Para isto, foram suspensas colônias em 5,0mL de solução salina estéril 0,85%, contidas em tubos de ensaios, até obter uma suspensão equivalente a 0,5 da escala de McFarland (1×10^6 a 5×10^6 células/ml) (CLSI, 2004).

4.9 MÉTODO DE DISCO DIFUSÃO

Para o método de disco difusão foi utilizado o ágar Mueller-Hinton (Becton,Dickinson & CO, Michigan, USA) com 2% de glicose ($0,5\mu\text{g/mL}$), no qual foi inoculado, com swab, o inóculo fúngico, através da técnica de esgotamento em estria com rotação da placa em ângulo de 60° por três vezes. A Figura 5 ilustra o uso do método de disco difusão.

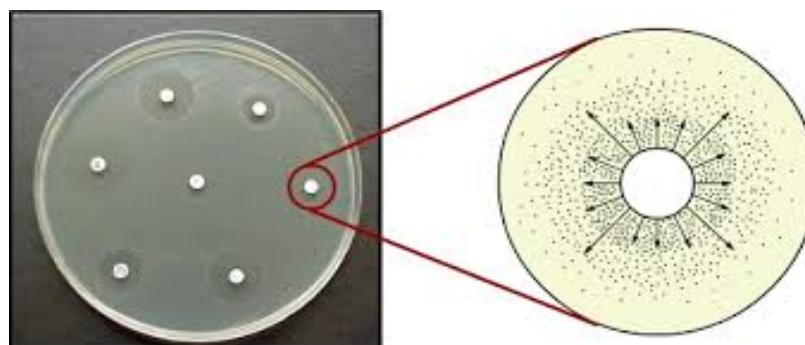


Figura 5: Método de disco difusão
Fonte: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)

Após a inoculação, foram aplicados os discos, com os extratos impregnados, sobre o meio e as placas foram incubadas a 35°C (\pm 2°C) por até 48 horas (CLSI, 2004). Foram utilizados como controle positivo disco de Itraconazol 25 μ g (*Sensifungidisc* de Itraconazol, Cecon, São Paulo, SP, Brasil) de 6,35 mm de diâmetro, estéreis e conservados a temperatura de 2 e 8°C (CLSI, 2004), e, como controles negativos, discos de papel embebidos em DMSO.

Todos os extratos e controles foram testados em triplicata e calculada a média dos diâmetros dos halos de inibição (RAZMAVAR et al., 2014).

4.10 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS POR MÉTODOS CLÁSSICOS – TESTE DE ESPECIFICIDADE

Na identificação macroscópica, os isolados clínicos apresentaram morfologia característica de fungos leveduriformes em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol após 48 horas de incubação a 35°C (\pm 2°C), colônias circulares, com bordas regulares e/ou irregulares, textura cremosa, superfície lisa, brilhosa e coloração branca a creme (Figura 6).



Figura 6: *Candida albicans* cultivada em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol por 48 horas
Fonte: Dados primários da pesquisa

Quando analisadas microscopicamente, com a coloração de Gram, as leveduras apresentaram formato oval, com ou sem brotamento (Figura 7).

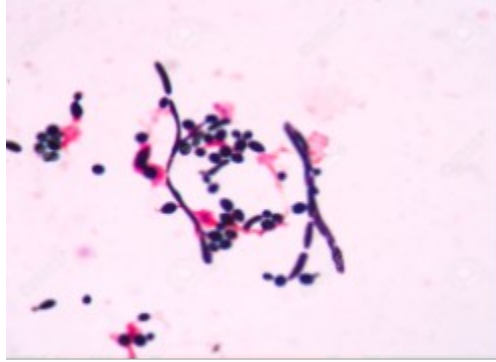


Figura 7: *Candida albicans*: leveduras com e sem brotamento e algumas pseudo-hifascoradas com Gram (aumento 1.000x).

Fonte: Dados primários da pesquisa

Na identificação presuntiva com o meio CHROMagar™ *Candida*, os isolados que apresentaram colônias em tons de verde foram identificados como *Candida albicans* (Figura 8).

As cepas de referências de *Candida albicans* ATCC 20735, *Candida krusei* ATCC 14243, *Candida tropicalis* ATCC 750, utilizadas como controle, apresentaram cores equivalentes aos padrões estabelecidos pelo fabricante: verdes para *C. albicans*, azuis para *C. tropicalis* e rosa para *C. krusei*. Em nossa pesquisa, 92% dos isolados foram positivos para *C. albicans* e 8% restantes, espécies não-*albicans*.

Para os testes com os extratos botânicos, foi utilizada apenas a espécie *Candida albicans* isolada nessa pesquisa.

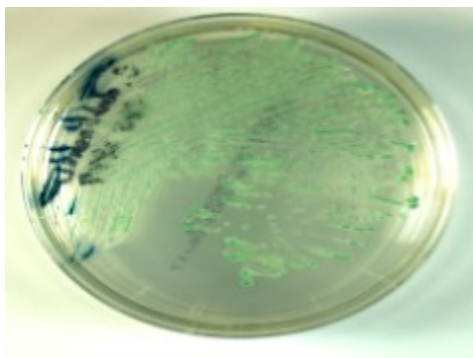


Figura 8: Colônias em tons de verde identificadas como *Candida albicans* em cultivo com o meio CHROMagar™ *Candida* (Difco – BD & CO).

Fonte: Dados primários da pesquisa

4.11 LEITURA E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DO EXPERIMENTO

A leitura dos resultados foi realizada medindo com paquímetro, que é instrumento empregado para medir precisamente pequenas distâncias, espessuras etc., constante de uma escala graduada fixa, duas garras e um cursor com um nônio.

A margem do halo de inibição é a área que não mostra crescimento evidente, visível a olho nu. Os diâmetros dos halos de inibição do crescimento foram observados em volta dos discos. Para este estudo, foram considerados extratos com atividade inibitória aqueles que apresentaram diâmetro de inibição $\geq 10\text{mm}$ e os extratos sem atividade inibitória aqueles que apresentaram diâmetro $< 10\text{mm}$. Esses valores de halos de inibição são padronizados como válidos para testes com preparo fúngico pela norma de padronização de testes de sensibilidade internacional (Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

5 RESULTADOS

5.1 DETERMINAR QUANTITATIVAMENTE A ATIVIDADE ANTIMICÓTICA *IN VITRO* DOS EXTRATOS ETANÓLICO E METANÓLICO SOBRE AMOSTRAS ANTIFÚNGICAS ISOLADAS ATRAVÉS DAS MEDIDAS DO CRESCIMENTO DO HALO DE INIBIÇÃO.

Foram testados os extratos vegetais etanólicos e metanólicos de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. e *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq., para a verificação de atividade antifúngica contra a espécie *Candida albicans*, como demonstram as Figuras 9 e 10.

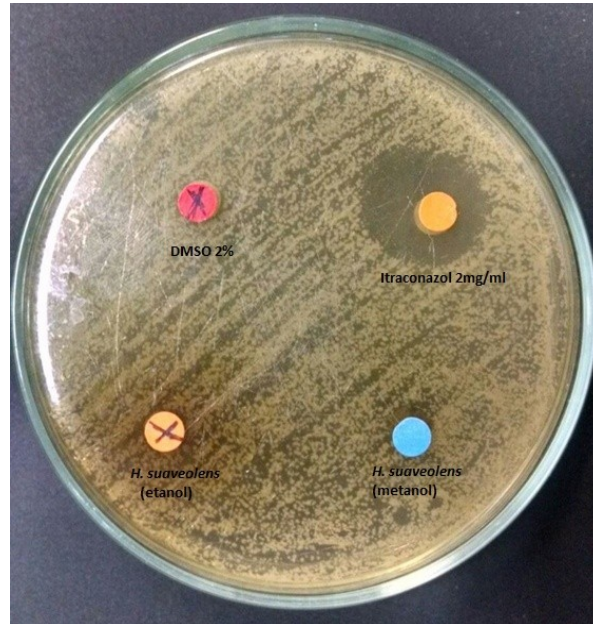


Figura 9: (*Hyptis suaveolens*) - Nenhum dos extratos apresentou inibição do crescimento das colônias de *Candida albicans*. Apenas o controle positivo, Itraconazol, apresentou halo de inibição de 21 mm de diâmetro

Fonte: Dados primários da pesquisa

Nenhum dos extratos apresentou inibição do crescimento das colônias de *Candida albicans*. Apenas o controle positivo, Itraconazol, droga já inserida no mercado para tratamento antifúngico, apresentou halo de inibição de 21 mm de diâmetro.

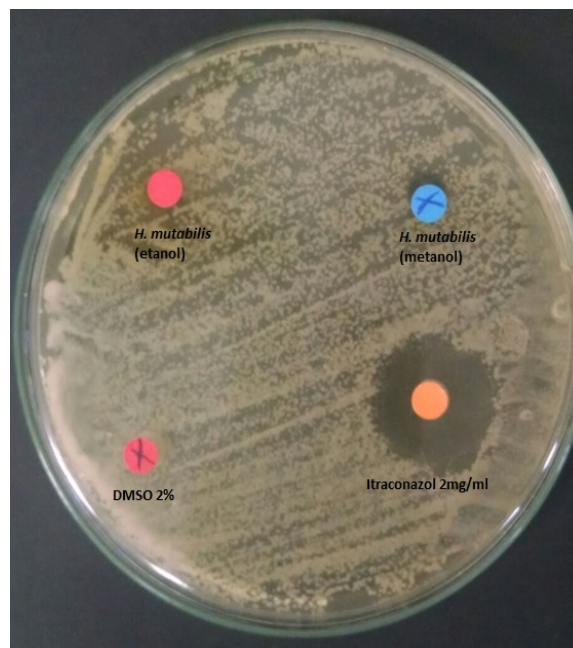


Figura 10: (*Hyptis mutabilis*) - Nenhum dos extratos apresentou inibição do crescimento das colônias de *Candida albicans*. Apenas o controle positivo, Itraconazol, apresentou halo de inibição de 21 mm de diâmetro

Fonte: Dados primários da pesquisa

6 DISCUSSÕES

Verificou-se que os resultados encontrados não apontaram dados positivos, portanto, a atividade do extrato bruto vegetal da *Hyptis suaveolens* (L.) *poit.* e a *Hyptis mutabilis* foi negativa sobre a *Candida albicans* *in vitro* isolada, o que impossibilita a criação de um fármaco com seu princípio ativo, com essa metodologia exata empregada nesta experimental.

Porém, o extrato bruto da *Hyptis suaveolens* apresentou alguma atividade, não foi o suficiente para inibir o crescimento as cepas da *Candida albicans*. Esse resultado pode ter sido influenciado pela qualidade da amostra coletada, visto que a literatura mostra diferenças na qualidade e desenvolvimento vegetal devido ao habitat em que a planta é cultivada.

Um estudo feito no Estado de São Paulo, 1995 acompanhou o desenvolvimento de populações de *Hyptis suaveolens* (L.) *Point.* em três localidades Paulista, com o objetivo de verificar, entre outros, a consequência da variação química dos monoterpenos que nelas ocorrem. Os resultados sugerem que essa variabilidade química dentro de populações vegetais é importante estratégia de defesa da planta para sua sobrevivência contra pragas (Bragantia, 1995).

Destaca-se a importância desta pesquisa considerando que foram analisadas amostras *Hyptis suaveolens* (L.) *Poit* e *H. mutabilis* com objetivo de verificar suas atividades antifúngicas. Após todas as etapas, foi possível observar que o extrato vegetal não apresentou atividade de combate às cepas da *Candida*. A partir do resultado negativo observado neste estudo é possível destacar a variabilidade da *Hyptis suaveolens* (L.) *Poit.* e *Hyptis mutabilis* (Rich.) *Brig.*, considerando que a literatura a descreve de forma positiva para tratamento de infecções fúngicas causadas pelo patógeno do gênero *Cândida*.

Trata-se uma planta que se propaga a partir de sementes, o que explica sua alta variabilidade genética, o que afeta a composição química do seu extrato e do óleo essencial, bem como sua atividade biológica. Esta variabilidade genética está diretamente relacionada com sua posição geográfica, considerando as condições ambientais, épocas de colheita, as condições de cultivo, o tipo de solo e a parte da

planta utilizada, com a latitude assumindo como um dos principais fatores de influência na composição química. Em latitudes baixas se tem produção de sesquiterpenos e em latitudes mais altas de monoterpenos (Azevedo et al., 2002; Oliveira et al., 2001; Andrade, 2013).

Branquinho (2015) ratifica que as diferenças atribuídas aos resultados variados *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. São decorrentes da origem geográfica das plantas. A pesquisa realizada por Azevedo et al. (2002), que analisou a composição de nove amostras de óleo essencial de *H. suaveolens*, de plantas individuais em fase de frutificação do Cerrado brasileiro investigadas por GC-MS identificou que Espatuleno, 1,8-cineol e (E)-cariofileno foram os principais constituintes, com a latitude se mostrando como principal fator ambiental que influenciou a composição dos óleos, verificando-se a produção de sesquiterpenos principalmente nas amostras cultivadas em latitudes e altitudes menores.

Sobre essa variabilidade genética da *Hyptis suaveolens* (L.) Poit., Falcão e Menezes (2003) afirmam que essas plantas variam em inúmeras classes de micromoléculas, existindo representantes da via do ácido acético, da via do ácido chiquímico e provenientes de biossíntese mista.

Por sua vez, Barbosa et al. (2013) verificaram que as quantidades de monoterpenos mais altamente oxidados e os sesquiterpenos aumentaram à medida que as plantas crescem do platô central brasileiro para perto da região amazônica.

Os autores observaram importante atividade contra a *Candida Albicans* pelos óleos essenciais de *Hyptis suaveolens* crescidas em Ibadan (Nigéria), que apresentaram inibidores significativos contra dois gram-positivos e quatro gram-negativos com concentração de 5 mg mL⁻¹.

Como se verifica o resultado apresentado neste estudo não é algo corriqueiro, porém, mostra um caminho a não ser seguido, sendo necessárias maiores investigações relacionadas às características das *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. e *H. mutabilis* colhidas na região do Cerrado para que de fato se possa entender o que trouxe essa limitação. Entendendo-se que a localização geográfica das plantas influencia diretamente nos seus mecanismos de ação, tendo em vista que os efeitos da *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. e *H. mutabilis* já é algo consolidado na literatura publicada.

A pesquisa realizada por Ngozi et al. (2014) demonstrou que a *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. Possui maior eficácia antifúngica quando utilizada a planta

inteira em comparação com as hastes e raízes em extratos de clorofórmio e metanol.

Enquanto isso, a pesquisa realizada por Nayaki et al. (2010) apresentou resultado positivo com o uso de extratos de metanol preparados a partir de *H. suaveolens* para inibir o crescimento de alguns microrganismos em um rastreio antimicrobiano preliminar contra *Candida albicans* e bactérias gram-positivas e gram-negativas selecionadas.

A análise realizada por Mondal e Pati (2007) também apresentou resultado positivo, com os microrganismos estudados mostrando óbvias diferenças em sua susceptibilidade com o uso dos extratos de folhas da *H. suaveolens*. Os óleos essenciais foram verificados como principais constituintes do vapor extrato de destilação. Óleos voláteis de *H. suaveolens* com principal componente de β -cariofileno, 1,8-cineol e sabineno, e β -pinene 6, sesquiterpenos e monoterpenos, terpenoides e esteróis.

Os mecanismos pelos quais os extratos podem inibir o crescimento de microrganismos são variados e podem ser explicados em parte devido à natureza hidrofóbica de alguns componentes do extrato. Esses componentes podem interagir ou não com a dupla camada lipídica da membrana celular que afetam a cadeia respiratória e a produção de energia dos fungos ou até mesmo tornam as células mais permeáveis a antibióticos e antifúngicos, levando à interrupção da atividade celular, conseqüentemente, eliminando os microrganismos. Foi o que não aconteceu no experimento. Os extratos não apresentaram atividade suficiente para eliminar esse tipo de fungo.

Então, os extratos podem não ter tido essa atividade na membrana celular dos fungos. Na maioria dos fungos, a parede celular é complexa e constituída de quitina também encontrada no exoesqueleto dos insetos.

O extrato precisava inibir a síntese do ergosterol em células fúngicas. O ergosterol é um componente vital da membrana celular dos fungos. Todos os fungos apresentam envoltório nuclear persistente durante a divisão celular. *Candida albicans* é uma espécie de fungo diploide com estrutura complexa. Por isso o extrato pode não ter tido características suficientes para conseguir destruir a cândida.

As infecções fúngicas causadas pelo patógeno do gênero *Candida* têm preocupado especialistas, tendo em vista que são as mais comuns presentes nas mucosas, na pele e na cavidade bucal, sendo significativa também sua presença

nas infecções hospitalares. Além disso, destaca-se que entre 70 e 75% de todas as mulheres em idade reprodutiva desenvolvem candidíase vulvo-vaginal (Andreola et al., 2016; Glehn; Rodrigues, 2012; Bbrandolt et al., 2017; Victorio et al., 2017). Desse modo, buscar fármacos que possam combater os problemas ocasionados, reduzindo os efeitos dos sintomas e promovendo a saúde do paciente se faz fundamental.

Apesar do resultado negativo, esta pesquisa impulsiona um novo caminho para pesquisas nessas áreas.

Há várias possibilidades que podem ser aventadas para a não positividade do material teste sobre estes fungos. Uma delas é o emprego neste experimento de todas as partes da planta para formular o extrato vegetal. Um novo caminho poderia verificar separadamente as porções vegetais, tais como: somente extratos de folhas, flores, caules ou raízes para quantificar a ação antifúngica com mais atividade entre eles.

Outro ponto importante relatado no decorrer do trabalho foi a questão da localização regional de coleta da planta, pois seria necessário um estudo mais detalhado sobre sua variabilidade genética, incluindo características do solo, e climatológicas, para obter-se dados mais precisos, pois ainda há limitação na literatura científica para essa questão.

A pesquisa inicialmente seria desenvolvida na cidade de Mossoró/RN, porém, por limitações na precipitação pluviométrica no Estado do Rio Grande do Norte (RN), e, pelas amostras necessariamente deverem, segundo esta metodologia, ser coletadas em seu habitat natural após um bom período chuvoso, optou-se, pela realização da mesma no Estado de Mato Grosso do Sul/ MS, por apresentar maior índice de chuva, presença de rios e uma parceria já firmada anteriormente com a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campus de Três Lagoas (MS).

7 CONCLUSÕES

Os resultados das análises foram negativos, impossibilitando a quantificação da ação dos extratos etanólicos e metanólicos vegetais.

Este estudo sugere que houve limitação da atividade antimicótica após resultados da análise e revisão da literatura, devido, entre outros possíveis fatores, a localização geográfica de coleta da *Hyptis suaveolens* (L.) Poit, e *Hyptis mutabilis*

por apresentarem variabilidades genéticas.

O resultado encontrado neste estudo fez surgir uma nova possibilidade de pesquisas, já que ratificou a influência da variabilidade genética e química dessas plantas, de acordo com sua distribuição geográfica, que fez sugerir essa questão.

Fazem-se necessárias análises mais específicas para identificar e caracterizar essas diferenças de forma mais clara, já que ainda são escassas as pesquisas na área.

Sugere-se a elaboração de novos extratos com partes separadas das plantas (somente as folhas, flores, caules ou raízes) e/ou concentrações diferentes desses mesmos extratos.

Recomenda-se, portanto, que novos estudos se deem no sentido de determinar as características específicas da *Hyptis suaveolens* (L.) Poit e *Hyptis mutabilis* de acordo com cada região brasileira, comparando o perfil geográfico do local com as propriedades da planta para que o desenvolvimento de fármacos com essa planta possa ter subsídios necessários para justificar seus resultados com maior empoderamento.

REFERÊNCIAS

Abranches VM. Plantas Medicinais e Fitoterápicos: abordagem teórica com ênfase em nutrição. São Paulo: AS Sistemas, 2015.

Abrantes MR, Lima EO, Medeiros MAP. Menezes, CP. Guerra, QSG. Milian, EP. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre leveduras *Candida não albicans*. Rev. Bras. Farm. 2013; 94(3): 227–33.

Andrade HB. Micropropagação e análise de constituintes voláteis in vitro de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. Dissertação [Mestrado em Agronomia/Fitotecnia]. Lavras: Universidade Federal de Lavras; 2013.

Andreola P, Demathé A, Galafassi G, Estelamari B, Elsemann, RB, Gazzoni AF. Estudo comparativo entre a produção de fosfolipases extracelulares e proteinases do gênero *Candida* isoladas a partir de infecções de cavidade oral. Rev Odontol UNESP. 2016; 45(4): 219-26.

Arruda MVM. Estresse hídrico e adubação na produção de biomassa e óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. Mossoró - RN. Dissertação [Mestrado em Ciências Naturais]. Mossoró: Universidade do Estado do Rio Grande do Norte; 2015.

Azevedo LFP, Faria TSA, Pessanha FF, Araujo MF, Lemos GCS. Triagem fitoquímica e atividade antioxidante de *Costus spicatus* (Jacq.) S.w. Rev. Bras. Pl. Med. 2014; 16(2): 209-15.

Azevedo NR, Campos IFP, Ferreira HD, Portes TA, Seraphin JC, PAULA JR. et al. Essential oil chemotypes in *Hyptis suaveolens* from Brazilian Cerrado. Biochemical Systematics and Ecology. 2002; 30(3): 205-16.

Badanai JM. Controle de qualidade de drogas vegetais comercializadas em São Caetano Do Sul – SP, presentes no anexo I, da RDC no. 10 de 09 de março de 2010. Universidade Municipal De São Caetano Do Sul – USCS. Projeto De Iniciação Científica, 2011/2012. São Caetano do Sul. 2011.

Barbosa JS. et al. Água disponível em cambissolo húmico sob sistemas agroflorestais. Curitiba: Paraná; 2014.

Bespalhok FJC, Guerra EP, Oliveira R. Melhoramento para resistência a doenças. Curitiba: UFPR; 2007. [acesso em 2017 jun 2]. Disponível em: <http://www.bespa.agrarias.ufpr.br/paginas/livro/capitulo%2011.pdf>

Bossolan, NRS. Introdução à Microbiologia: disciplina biologia 3. São Paulo: Ed. IFSC – USP; 2002.

Brandolt TM, Klafke GB, Gonçalves CV, Bitencourt LR, Martinez AMB, Mendes JF. et al. Prevalence of *Candida* spp. in cervical-vaginal samples and the in vitro susceptibility of isolates. *Brazilian journal of microbiology*. 2017; 48: 145–50.

Branquinho NAA. Avaliação de teor e composição química dos óleos essenciais de três espécies de *Hyptis*, submetidas a diferentes velocidades e temperaturas de secagem. Dissertação [Mestrado em Agroquímica]. Rio Verde: Instituto Federal Goiano; 2015.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Dermatologia na Atenção Básica. 1ª edição. Série Cadernos de Atenção Básica; n. 09 – DAB Série A. Normas e Manuais Técnicos; n. 174 - MS - Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n. 14, de 5 de abril de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos [texto da internet]. *Diário Oficial da União, Brasília (DF)*; 2010 mar 31 [citado 2010 abr 5]. Disponível em: www.crfma.org.br/site/arquivos/legislacao/resolucoesinstrucoesnormativas/RDC%2014%202010.pdf

_____. Secretaria de Vigilância em saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

_____. Ministério da Saúde do Brasil. Uso de plantas medicinais e fitoterápicos sobe 161%. Portal Brasil, 2016. [acesso em 2016 ago 20]. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2016/06/uso-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-sobe-161>.

_____. Ministério da Saúde do Brasil. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fototerápicos Série B. Textos Básicos de Saúde, 2006. [acesso em 2016 ago 20]. Disponível em: [/http://www.saude.gov.br/bvs](http://www.saude.gov.br/bvs)

_____. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Dermatologia na Atenção Básica / Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde. Série Cadernos de Atenção Básica; n. 09. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

Clinical and Laboratory Standards Institute -CLSI. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Guideline. Wayne, Pensilvânia: USA, 2004.

Falcão DQ, Menezes FS. Revisão enofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. Rev. Bras. Farm. 2003; 84(3): 69-74.

Fernandes TM. Plantas medicinais: memória da ciência no Brasil [online]. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2004.

Ferreira SB, Dantas IC, Catão RMR. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de sucupira (*Pterodon emarginatus* Vogel). Rev. Bras. Pl. Med. 2014; 16(2): 225-30.

Freire-benítez V, Preço RJ, Buscaino A. A cromatina de *Candida albicans* Pericentromeres Bears Características da euchromatin e da heterocromatina. Fronteiras em microbiologia. 2016; 7.

Freitas A, Aziz GSJ, Ricardo V, Elias AJ. Mercado de medicamentos fitoterápicos no Brasil. Abesbrasil, 2010.

Gazeta JÁ, Grigoletto ARL, Fregonezi PAG. Candidíase Vaginal: uma questão de educação em saúde. Brazilian Journal of Health. 2011; 2: 89-96.

Glehn EAV, Rodrigues GPS. Antifungigrama para comprovar o potencial de ação dos extratos vegetais hidroglicólicos sobre *Candida* sp. (Berkhout). Rev. Bras. Pl. Med. 2012; 14(3): 435-38.

Gois MAF, Lucas FCA, Costa JCM, Moura PHB, Lobato GJM. Etnobotânica de espécies vegetais medicinais no tratamento de transtornos do sistema gastrointestinal. Rev. Bras. Pl. Med. 2016; 18(2): 547-57.

Larone DH. Medically Important Fungi: a Guide to Identification. Washington: ASM PRESS, 1995.

Lopes AA, Guimarães DO, Pupo MT. Quando os micro-organismos salvam vidas. *Ciência Hoje*. 2011; 48(286): 30-5.

Lorenzi H, Mattos FJA. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

Manfio GP. Microbiota. Ministério Do Meio Ambiente. Secretaria De Biodiversidade E Florestas Diretoria De Conservação Da Biodiversidade. Projeto Estratégia Nacional De Diversidade Biológica; 2000. [acesso em 2016 set 06]. Disponível em: http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/_arquivos/microb1.pdf

Martins FT, Polo, M. Desenvolvimento reprodutivo de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.: relação entre fotoperíodo, densidade celular meristemática e padrão de expressão de um ortólogo putativo do gene LEAFY de arabisopsis. *Rev. bras. Bot.* 2009; 32(1): 131-42.

Martins FT, Santos MH, Polo M, Barbosa LCA. Variação química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) poit., sob condições de cultivo. *Quim. Nova*. 2006; 29(6): 1203-09.

Mondal KC et al. Atividade antimicrobiana dos extratos foliares de *Hyptis suaveolens* (L.) poit. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007; 69(4): 568.

Montes RA et al. Qualidade microbiológica de drogas vegetais utilizadas na fitoterapia popular. *Revista Espacios*. 2017; 38(11): 12-8.

Nayak AE, Dodagatta-Marri AGT, Kishore U. An Insight into the Diverse Roles of Surfactant Proteins, SP-A and SP-D in Innate and Adaptive Immunity. *Front Immunol*, 2010, 3:131.

Neufeld, PM. *Manual de micologia médica: técnicas básicas de diagnóstico*. Rio de Janeiro: Programa Nacional de Controle de Qualidade, 1999.

Ngozi LU, Ugochukwu N, Ifeoma PU, Chinyelu IE. A Eficácia de *Hyptis Suaveolens*: Uma Revisão de suas Aplicações Nutricionais e Medicinais. *European Journal of Medicinal Plants*. 2014; 4(6): 661-74.

Odds FC, Bernaerts R, CHROMagar. Candida, a new differential isolation médium for presumptive identification of clinically important Candida species. *Journal of Clinical Microbiology*. 1994; 32(8): 1923-29.

Oliveira JMS, Mariath JEA, Bueno DM. Desenvolvimento floral e estaminal no clone CP76 de *Anacardium occidentale* L.: cajueiro-anão precoce (Anacardiaceae). *Revista Brasileira de Botânica*. 2001; 24: 377-88.

Queiroz-Voltan RB, et al. Variação de Terpenos em *Hyptis suaveolens* e seu papel na defesa contra herbívoros. *Bragantia*. 1995; 54(2): 217- 35.

Razmavar S, Abdulla MA, Ismail SB, Hassandarvish P. Antibacterial Activity of Leaf Extracts of *Baekkea frutescens* against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Biomed research international*. 2014; 1: 1-5.

Rezende JR, Rodrigues SB, Jabor IAS, Pamphiiie JA, Rocha LMSC. Efeito antimutagênico do látex de *Euphorbia tirucalli* no sistema metionina em *Aspergillus nidulans*. *Acta Scientiarum Biological Sciences*. 2004; 26(4): 481-84.

Santos LMO, et al. Análise de amostras de flores de Calêndula (*Calendula officinalis* L., Asteraceae) comercializadas na grande Curitiba. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2015; 36(2): 251-58.

Silva CG, et al. Ethnobotanical survey of medicinal plants in the Caatinga area in the community of Sitio Nazaré, Milagres, Ceará, Brazil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s. 2015; 17(1): 133-42.

Silva MS, Rangel FEP, Paz SL, Borges MM. Comprovação da qualidade físico-química e microbiológica de paracetamol oral comercializado no último ano de validade. V Semana de Iniciação Científica da Faculdade de Juazeiro do Norte. Desafios IES Privadas: Crescimento, responsabilidade social, ética e pesquisa. 2013.

Silva PA. Controle De Qualidade Da Camomila Comercializada Em Maringá – Paraná. V EPCC Encontro Internacional de Produção Científica. 2007.

Souza FS, Maciel CC. Produtos fitoterápicos e a necessidade de um controle de qualidade microbiológico. *VEREDAS FAVIP - Revista Eletrônica de Ciências*. 2010; 3(2).

Souza PM, et al. Plants from Brazilian Cerrado with Potent Tyrosinase Inhibitory Activity. Plos One. 2012; 7(11): 1-7.

Tafurt-garcía G, Jiménez-vidal LF, Calvo S. Antioxidant capacity and total phenol content of *Hyptis* spp., *P. heptaphyllum*, *T. panamensis*, *T. rhoifolia* and *Ocotea* sp. Rev. Colomb. Quim. 2015; 44(2): 28-33.

Tamada AC, et al. Avaliação microbiológica de fitoterápicos com *Ginkgo biloba* procedentes de farmácias do município de Votuporanga – SP. Rev. Bras. Farm. 2011; 92(3): 166-70.

Tesch NR, Yáñez RM, Rojas XM, Fermín LR, Carrillo JV, Díaz T, et al. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Hyptis suaveolens*. Rev. peru. biol. 2015; 22(1): 103-07.

Turolla MSR, Nascimento ES. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2006; 42(2).

Verjovsky M. Estudo de caso: diferentes visões sobre microrganismos. 2009. Dissertação [Mestrado em Educação, Gestão e Difusão em Biociências] Rio de Janeiro: Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ, 2007.

Victorio GB, Bourdon LMB, Benavides LG, Huerta-Olvera SG, Plascencia A, Villanueva J, Martinez-Lopez E, Hernández-Cañaveral II. Antifungal activity of caspofungin in experimental infective endocarditis caused by *Candida albicans*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2017: 10-20.

Zoghbi MGB, Jardim MAG, Oliveira J, Trigo JR. Composição química dos óleos essenciais de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.: uma espécie de ocorrência natural no nordeste paraense. Rev. Bras. Farm. 2008; 89(1) 06-09.