

Caracterização fitoquímica e atividade antifúngica do extrato etanólico obtido da mistura de sementes e vagens de *Caesalpinia echinata* Lam

Phytochemical characterization and antifungal activity of the ethanolic extract obtained from the seed and pod mixture of *Caesalpinia echinata* Lam

DOI:10.34115/basrv6n2-003

Recebimento dos originais: 18/02/2022

Aceitação para publicação: 14/03/2022

Yhasminie Karine da Silva Xavier

Mestre em Morfotecnologia

Instituição: Departamento de Histologia e Embriologia, Centro de Biociências

Universidade Federal de Pernambuco

Endereço: CEP: 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil

E-mail: yhasminiekarine73@gmail.com

Marcela de Araújo Sobral

Doutora em Ciências Biológicas

Instituição: Departamento de Antibióticos, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco

Endereço: CEP: 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil

E-mail: marcela.clementino@ufpe.br

Gláucia Manoella de Souza Lima

Doutora em Ciências Biológicas

Instituição: Departamento de Antibióticos, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco

Endereço: CEP: 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil

E-mail: gmslima@yahoo.com.br

Túlio Diego da Silva

Doutor em Ciências Biológicas

Instituição: Central Analítica, Centro de tecnologias estratégicas do Nordeste, CETENE

Endereço: CEP: 50740-545, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil

E-mail: diegonunes.oliveira@outlook.com

Anne Maely Mariade Sales Ferreira

Mestre em Morfotecnologia

Instituição: Departamento de Antibióticos, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco

Endereço: CEP: 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil

E-mail: annemaely@hotmail.com

Fernanda Aguiar de Souza

Mestranda em Ciências Farmacêuticas
Departamento de Antibióticos, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco
Endereço: CEP: 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil
E-mail: fernandaaguiardesouza@hotmail.com

Ivone Antônia de Souza

Doutora em Farmacologia
Instituição: Departamento de Antibióticos, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco,
Endereço: CEP: 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil
E-mail: idesouza5@gmail.com

Carina Scanoni Maia

Doutora em Biociência Animal
Instituição: Departamento de Histologia e Embriologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco
Endereço: CEP: 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil
E-mail: carina.scanoni@gmail.com

RESUMO

O presente estudo focou em investigar o perfil fitoquímico através da técnica de análise de UPLC, bem como o potencial antifúngico do extrato etanólico obtido da mistura de semente e vagem de *Caesalpinia echinata* (EESVCe). O material vegetal foi coletado na Universidade Federal de Pernambuco e as moléculas identificadas no screening fitoquímico foram: ácido gálico, ácido siríngico e quercetina, pertencentes à classe de metabólitos dos compostos fenólicos. Quanto a avaliação da atividade microbiana, o EESVCe não apresentou atividade anti fúngica frente às cepas do gênero *Candida* testadas, bem como também não apresentou para o fungo filamentososo *Trichopyton rubrum*. Porém demonstrou atividade contra fungos da espécie *Trichopyton mentagrophytes*, evidenciando CMI de 200 µg/mL. Esse trabalho fornece dados importantes, contribuindo com futuras pesquisas para o possível desenvolvimento de medicamentos à base de *Caesalpinia echinata*, além de melhorar o conhecimento científico sobre o referido espécime.

Palavras-chave: UPLC, potencial antifúngico, *Caesalpinia echinata*.

ABSTRACT

The present study focused on investigating the phytochemical profile through the UPLC analysis technique, as well as the antifungal potential of the ethanolic extract obtained from the seed and pod mixture of *Caesalpinia echinata* (EESVCe). The plant material was collected at the Federal University of Pernambuco and the molecules identified in the phytochemical screening were: gallic acid, syringic acid and quercetin, belonging to the class of metabolites of phenolic compounds. As for the evaluation of microbial activity, the EESVCe did not show antifungal activity against the tested strains of the genus *Candida*, as well as it did not present for the filamentous fungus *Trichopyton rubrum*. However, it showed activity against fungi of the species *Trichopyton mentagrophytes*, showing MIC of 200 µg/mL. This work provides important data, contributing to future research for the possible development of drugs based on

Caesalpinia echinata, in addition to improving the scientific knowledge about this specimen.

Keywords: UPLC, antifungal potential, *Caesalpinia echinata*.

1 INTRODUÇÃO

A fitoquímica é ciência responsável por caracterizar estruturalmente, avaliar as propriedades e investigar a biossíntese de metabólitos secundários produzidos por organismos vivos (RODRIGUES et al., 2010). Os metabólitos secundários, formados geralmente por estrutura complexa e baixo peso molecular, são responsáveis por atividades biológicas marcantes e, ao contrário dos metabólitos primários, apresentam-se em baixas concentrações e em determinados grupos de plantas (BERG E LUBERT, 2008). Muitos destes compostos possuem importância farmacológica, pois representam uma fonte promissora para a descoberta de novas moléculas úteis ao homem (HAIDA et al, 2007).

Atualmente, os fitoterápicos constituem importante fonte de inovação terapêutica, sendo objeto de interesse industrial. Assim, a atividade antimicrobiana de extratos de plantas, óleos essenciais e seus componentes têm-se sido alvo de pesquisas no campo da medicina e terapêutica. Esse interesse justifica-se pelo aumento da resistência aos antimicrobianos sintéticos comerciais por patógenos associados a doenças infecciosas (REICHLING et al. 2009).

No crescente aumento do número de infecções fúngicas, especialmente em pacientes imuno-comprometidos, destaca-se a levedura *Candida albicans*. Esse microrganismo é o agente causador da maioria das candidíases, porém outras espécies do gênero *Candida*, incluindo *C. glabrata* e *C. krusei*, também estão sendo responsáveis pela ocorrência de muitas infecções (AHMAD et al. 2011).

Já os dermatófitos, compreendem um grupo de fungos filamentosos com propriedades queratinofílicas e queratinolíticas, e são classificados em três gêneros: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*. São capazes de infectar pele, pêlos e unhas, sendo diferenciados através de aspectos macroscópicos, microscópicos e fisiológicos (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; LARONE, 1996; LACAZ et AL., 2002).

A ocorrência de casos de resistência de leveduras e de dermatófitos a antifúngicos vem fazendo com que estudos sobre a atividade antimicrobiana sejam cada vez mais freqüentes (AHMAD et al. 2011; PERES, 2010).

Diante desse contexto, tem-se o espécime *Caesalpinia echinata* Lam, ou “pau-brasil”, uma angiosperma, pertencente à família Fabaceae. Este vegetal possui importantes potenciais econômicos, dentre os quais destacam-se suas atividades farmacológicas, como atividades antitumoral e antinociceptiva (GRANGEIRO, 2009) antibacteriana (SILVA et al., 2012) antioxidante e antiangiogênica (GOMES, 2014), que podem ser obtidas a partir de extratos de várias partes de vegetais, pertencentes à mesma família (SILVA et al., 2012).

Desta forma, o presente estudo focou em investigar o perfil fitoquímico através da técnica de análise de UPLC, bem como o potencial antifúngico do espécime *Caesalpinia echinata*, visto que o combate as infecções fúngicas através da utilização de medicamentos a base de extratos vegetais pode ser um caminho promissor a ser trilhado na luta contra a resistência microbiana e na redução das limitações do tratamento convencional, como efeitos adversos e a alta toxicidade.

2 METODOLOGIA

2.1 MATERIAL VEGETAL

Sementes e vagens de *Caesalpinia echinata* Lam foram coletadas na Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil, em janeiro e fevereiro de 2017. Amostras do espécime foram identificadas e depositadas, como exsiccata, no Herbário da Universidade Federal de Pernambuco com o número UFP 82.205.

2.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO

O extrato foi preparado pela mistura de 400g de sementes e vagens (200g de cada) de *C. echinata* Lam com 800 ml de etanol. O conjunto foi mantido à temperatura ambiente e agitando esporadicamente durante 12 dias e então filtrado com um filtro de celulose adaptado a funil montado em suporte específico. O filtrado resultante foi concentrado em rotaevaporador a vácuo, a temperatura de 60 °C.

2.3 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA

A técnica de análise utilizada para o estudo da caracterização fitoquímica foi a cromatografia líquida de ultra performance (UPLC). A referida cromatografia foi realizada com um cromatógrafo a líquidos de ultra performance (UPLC) Acquity H-Class (Waters) do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE). Foi empregada uma coluna BEH 2,1 x 100 mm e tamanho de partícula de 1,7µm.

As fases móveis utilizadas consistiram de solução aquosa contendo 2% de Metanol, 5 mM de formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico (eluente A) e solução metanólica contendo 0,1% de ácido fórmico (eluente B), que foram bombeadas a uma vazão de 0,3 mL/min. A eluição foi realizada em modo gradiente e a condição inicial (98% A/ 2% B) foi mantida por 25 minutos. A proporção de B foi aumentando linearmente para 99% em 8,5 minutos, se mantendo em 99% de B por um minuto, seguida da imediata diminuição para 2% de B, onde foi mantida até 11 minutos. Dez microlitros de amostra foram injetados. A temperatura da coluna foi mantida a 40 °C e o auto injetor a 10 °C. O sistema UPLC foi acoplado a um espectrômetro de massa single quadrupolo SQ Detector 2 (Waters). A voltagem do capilar foi de 3,5 kV, a voltagem do cone 30 V, a temperatura de dessolvatação foi de 450°C, com fluxo de gás da fonte de 650 L/h. A aquisição dos dados foi feita em modo fullscan, buscando massas entre 100 e 1000 Da, em ionização negativa. A aquisição dos cromatogramas e espectros de massas foram feitos através do software MassLynx™ (Waters).

2.4 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

A avaliação da atividade antifúngica dos compostos foi verificada através da metodologia proposta pelo Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI, EUA. Para os testes com fungos leveduriformes seguiu-se a norma M27-A2: Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica (Norma Aprovada) (CLSI, 2002b) e para os testes com fungos filamentosos a norma M38-A2: Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos (CLSI, 2002 a).

2.4.1 Cepas fúngicas

Foram utilizadas neste estudo, linhagens fúngicas procedentes da Coleção de Culturada Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA). Os microrganismos utilizados encontram-se dispostos na Tabela 1.

Tabela 1. Microrganismos testes utilizados na atividade antifúngica

Leveduras	Fungos Filamentosos
<i>Candida peliculosa</i> URM 6281	<i>Trichophyton rubrum</i> URM 5908
<i>Candida glabrata</i> URM 6393	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> URM 6272
<i>Candida albicans</i> URM 6401	
<i>Candida guilliermondii</i> URM 6403	
<i>Candida parapsilosis</i> URM 6408	

2.4.2 Método de Difusão em Disco de Papel – Leveduras

A metodologia difusão em disco de papel foi realizada segundo Bauer et al. (1966).

2.4.3 Padronização dos Inóculos

As leveduras foram inoculadas em ágar sabouraud e após 24 horas de incubação a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ foram suspensas em solução salina 0,9%. Essas suspensões foram padronizadas pela turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala McFarland (BARRY, 1986; KONEMAN 1997; NCCLS, 2003) e também analisadas em espectrofotômetro modelo Biospectro, SP 220, comprimento de onda de 530 nm, e densidade ótica entre 0,08 a 0,13. Esse valor corresponde a uma concentração de aproximadamente 10⁸ Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL, posteriormente, foi feita diluição desta suspensão para obter um inóculo na concentração de 10⁵ UFC/mL.

2.4.4 Semeio e teste de atividade

As suspensões das leveduras padronizadas foram semeadas em tapete, utilizando “swab” esterilizado e embebido com as mesmas, na placa contendo o meio de cultura Ágar Müller Hinton suplementado com 2% de glicose e 0,5 mg/mL de azul de metileno, de acordo com o protocolo M44-A (NCCLS, 2008)

Após a semeadura foram inseridos na superfície do meio, discos de papel filtro esterilizados, com 6 mm de diâmetro, os quais foram embebidos com 50 µL do extrato etanólico de sementes e vagens de *Caesalpinia echinata*, na concentração final de 1.000 µg/mL (1 mg/mL) em cada um dos discos, os quais foram posicionados de forma equidistante.

Em seguida, as placas foram incubadas durante 48 h à 37°C. Como controle negativo, foram utilizados discos de papel filtro saturado com 50 µL do solvente utilizado (etanol). Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

A avaliação consiste na mensuração do diâmetro dos halos de inibição, os quais devem ser expressos em mm pela média aritmética dos resultados obtidos nas duas repetições. Halos iguais e superiores a 10 mm são considerados positivos quanto à atividade antifúngica (PORTILHO et al., 2013).

2.4.5 Método Teste de Diluição em Caldo – Fungos Filamentosos

Os ensaios de inibição foram realizados pelo método de microdiluição em caldo usando placa de microtitulação de 96 poços de acordo com as diretrizes do documento NCCLS M38-A2 (2008).

2.4.6 Preparação dos inóculos fúngicos

Os fungos foram cultivados em placas contendo 10 mL meio de cultura Agar sabouraud para respectivo crescimento, durante 7 dias a 36 °C . Após o período de incubação, foi preparada uma suspensão de cada fungo segundo documento citado no item 2.4.5. Os inóculos foram suspensos em 5 mL de solução salina 0,9%, esterilizada, acrescida de 30 µL de tween 20 (necessário para fragmentar as hifas).

Em seguida, o sobrenadante dessa suspensão foi transferido para um tubo de ensaio e agitado em vórtex. Posteriormente, o sobrenadante foi deixado em repouso durante 3- 5 minutos e a análise da densidade das suspensões foi feita em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 530nm, e ajustadas a uma densidade óptica (DO) de 0,15 a 0,17.

Essas suspensões foram diluídas de 1:50, correspondendo a 2X a densidade necessária de 0,4 a 5 x 10⁴ UFC / mL.

2.4.7 Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Em microplacas de 96 poços foram adicionados 100 uL de caldo RPMI e, em seguida, foram feitas diluições seriadas do extrato etanólico nas concentrações de 1600 a 3,125 µg/mL.

Posteriormente, foram adicionados 100 μ L de cada suspensão fúngica. Como controles foram utilizados o meio de cultura com as suspensões fúngicas com e sem o solvente etanol. As microplacas foram incubadas a 36 $^{\circ}$ C, durante 50 h e após este tempo realizada a leitura para determinar a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento fúngico.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o intuito de identificar compostos presentes no extrato etanólico da associação de sementes e vagens de *Caesalpinia echinata* realizou-se a técnica de cromatografia líquida de ultra performance. O cromatograma obtido pela referida técnica permitiu a identificação de 3 compostos (Figura 1). Sendo eles o ácido gálico, o ácido siríngico e a quercitina com tempo de retenção de 3,01, 5,95 e 7,58 min respectivamente (Figuras 2, 3 e 4).

Figura 1. Cromatograma do EESV C_e

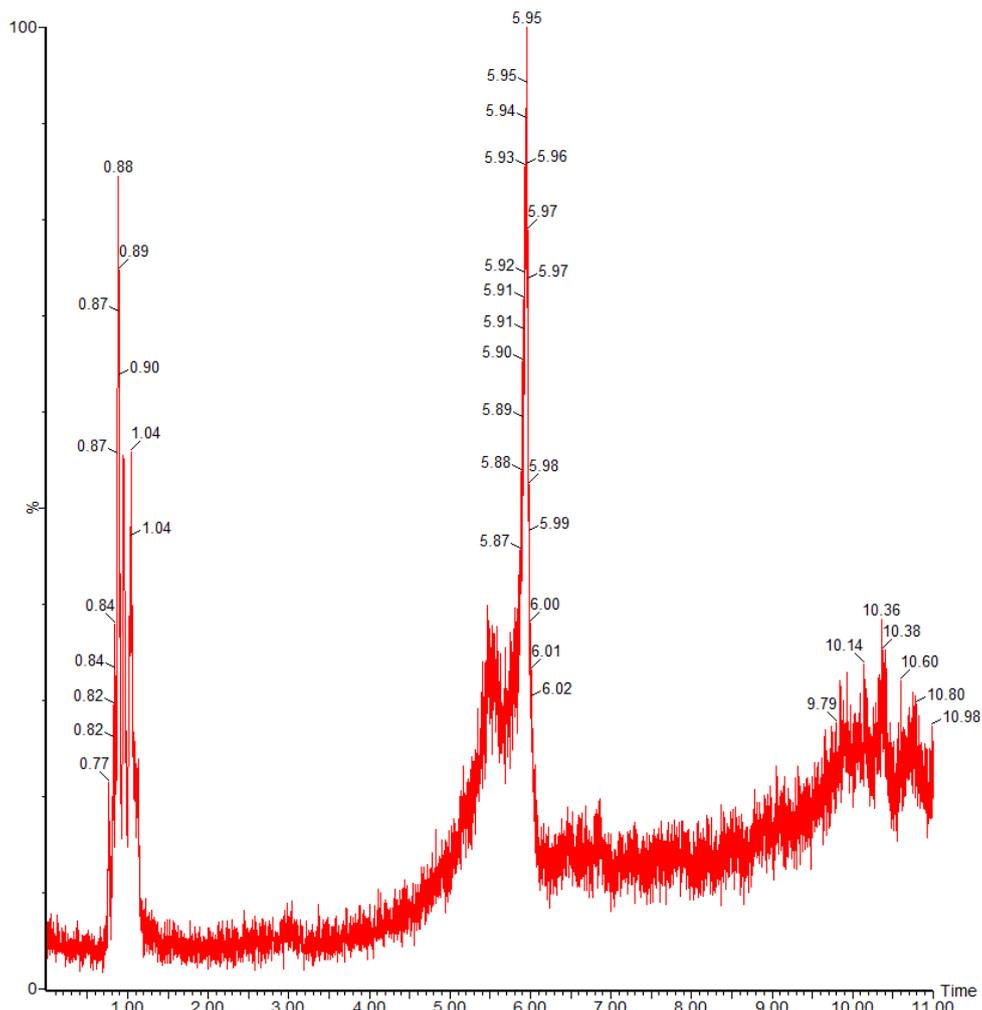


Figura 2. Cromatograma do EESVC identificando o ácido gálico como um dos compostos extraídos.

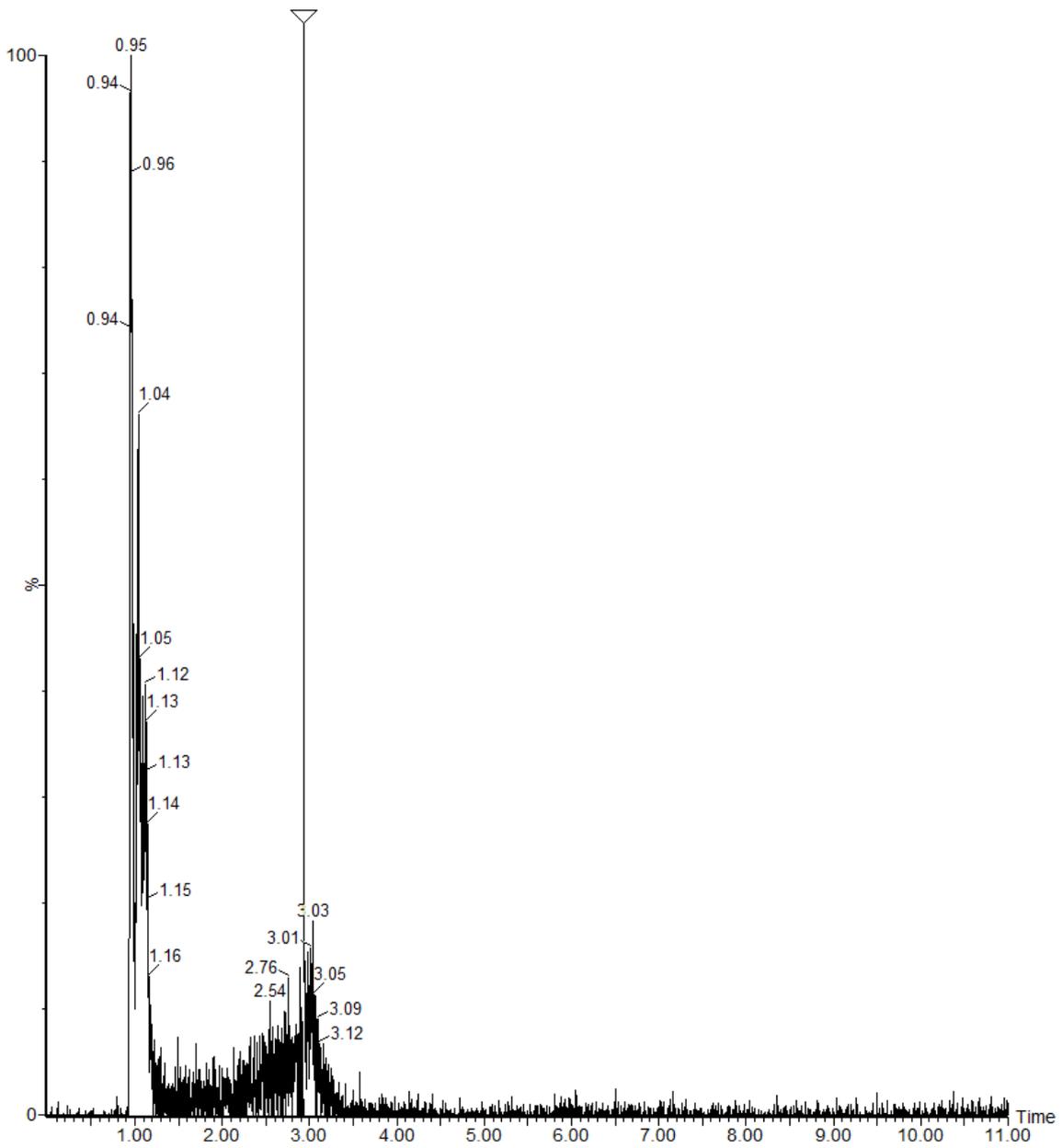


Figura 3. Cromatograma do EESV_{Ce} identificando o ácido sirínico como um dos compostos extraídos.

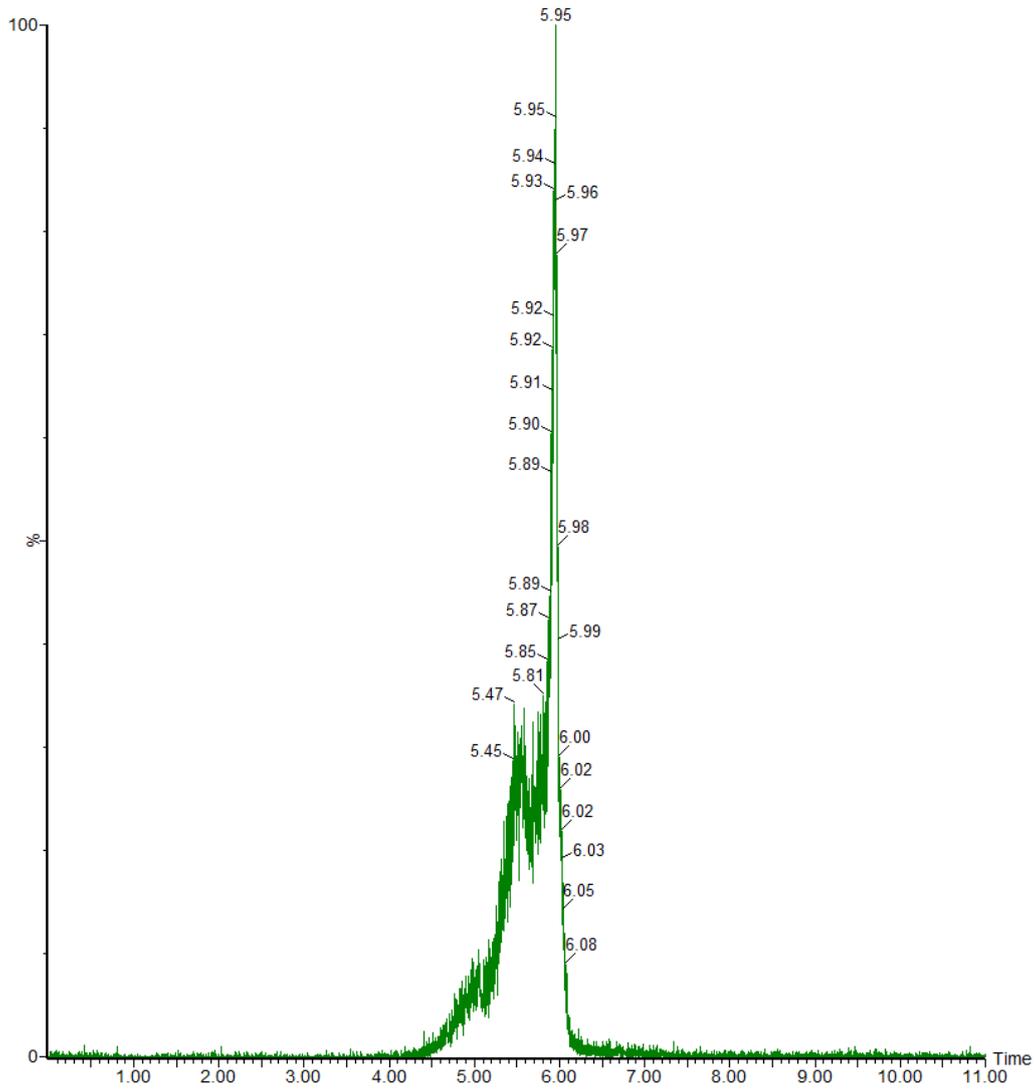
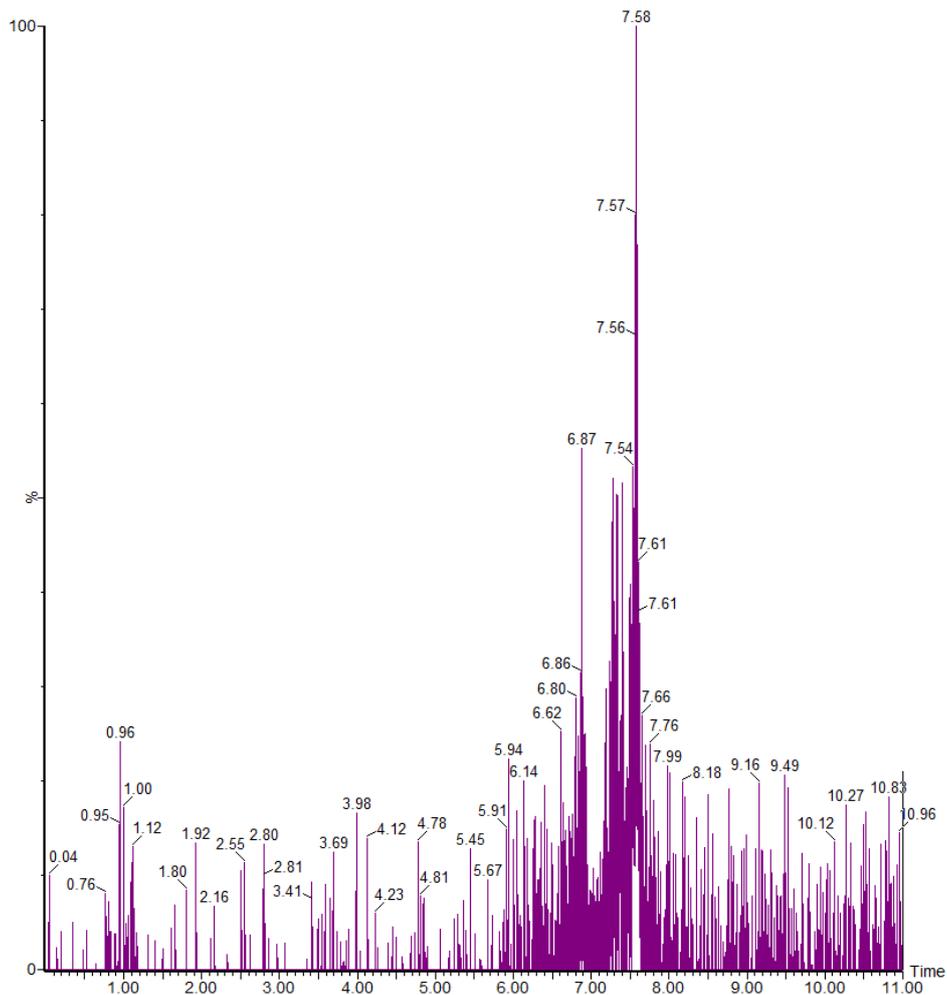


Figura 4. Cromatograma do EESV C_e identificando a quercetina como um dos compostos extraídos.



A análise por cromatografia líquida de ultra performance permitiu a identificação do ácido gálico, pertencente a classe dos compostos fenólicos, grupo dos flavonóides, com tempo de retenção de 3,01 min (Figura 2). Este composto tem demonstrado ação antimutagênica (GICHNER et al., 1987), antioxidante (KIM et al., 2002) e antitumoral (LOCATELLI et al., 2013). Além disso, foi possível reconhecer o ácido sirínico, um ácido fenólico também pertencente a classe dos compostos fenólicos, com tempo de retenção de 5,95 (Figura 3). Esse último metabólito identificado tem sido relatado como potente antioxidante (YAN, 2016). A análise possibilitou também a identificação do metabólito quercetina, um flavonóide natural, com um tempo de retenção de 7,58 min (Figura 4). A Quercetina vem sendo associada a feitos anticarcinogênicos, protetores do sistema renal, cardiovascular e hepático (BEHLING et al., 2004).

Não foi evidenciado na literatura realização de análise fitoquímica através da metodologia UPLC com o espécime *Caesalpinia echinata*. Sendo então este resultado inédito.

A identificação de compostos fenólicos corrobora com os resultados encontrados pelo autor e colaboradores em outro estudo, na análise fitoquímica realizada pela técnica de cromatografia em camada delgada (XAVIER et al., 2021).

Quanto a atividade microbiana, foi possível verificar que não houve atividade antifúngica do extrato etanólico da associação das sementes e vagens de *Caesalpinia echinata* frente às cepas do gênero *Candida* testadas, pois não houve crescimento do halo de inibição.

Em relação ao teste da suscetibilidade de fungos filamentosos pelo método de microdiluição em caldo, o EESV C_e apresentou CMI de 200 $\mu\text{g/mL}$ para o fungo *Trichophyton mentagrophytes*. Porém para o *Trichophyton rubrum* não houve atividade.

A técnica de difusão em disco de papel baseia-se na inibição do crescimento do microrganismo, seguindo-se da formação de um halo de inibição, na superfície do meio de cultura sólido semeado com o microrganismo-teste. O halo inibitório projeta-se ao redor de um disco de papel filtro impregnado com a substância em estudo. Este método informa se o microrganismo é sensível ou resistente a uma determinada substância numa concentração conhecida (KONEMAN et al. 2001).

Holetz et al (2002) e Regasini et al (2010) propuseram uma classificação para produtos vegetais com base nos resultados de CMI. Esta classificação considera que extrato de plantas com atividade antimicrobiana com valores de CMI menores que 100 $\mu\text{g/mL}$ têm atividade antimicrobiana promissora. Extratos de plantas com CMI entre 100-500 $\mu\text{g/mL}$ possuem atividade moderada, acima de 500 até 1000 $\mu\text{g/mL}$, a atividade é considerada fraca e superior a 1000 $\mu\text{g/mL}$ são considerados inativos.

Já Aligianis et AL. (2001), considerou como forte inibição CMI até 500 $\mu\text{g/mL}$, inibição moderada entre 600 e 1500 $\mu\text{g/mL}$ e fraca inibição CMI acima de 1600 $\mu\text{g/mL}$.

De acordo com os autores citados, o EESV C_e apresentou moderada a forte atividade antimicrobiana frente a espécie *Trichophyton mentagrophytes*.

Este é o primeiro relato de atividade antifúngica de *Caesalpinia echinata* na literatura.

Não foi possível comparar os resultados obtidos pelo método de microdiluição em caldo dos extratos de *C. echinata*, já que ainda não existem estudos publicados demonstrando as CMIs deste extrato pelo mesmo método.

4 CONCLUSÃO

A caracterização fitoquímica na análise de UPLC do EESV C_e indicou a presença decompostos fenólicos: flavonoides (ácido gálico e quercetina) e ácido siríngico. O referido extrato etanólico da associação das sementes e vagens de *Caesalpinia echinata* apesar de não ter apresentado atividade antifúngica contra fungos leveduriformes, apresentou atividade contra fungos da espécie *Trichopyton mentagrophytes*.

Além disso, nesta pesquisa, as três moléculas que foram identificadas (ácido gálico, quercetina e ácido siríngico) na espécie em questão, até então não haviam sido descritas em nenhum outro estudo publicado.

Esse trabalho fornece dados importantes, contribuindo com futuras pesquisas para o possível desenvolvimento de medicamentos à base de *Caesalpinia echinata*, além de melhorar o conhecimento científico sobre o referido espécime.

REFERÊNCIAS

AHMAD, A. et al. Antifungal activity of *Coriaria nepalensis* essential oil by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **Yeast**, v. 28, p. 611-617, 2011.

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CJINO, I.B. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two *Origanum* Species. **J. Agric. Chem.** v.49, p. 4168-4170, 2001.

BARRY, A. L. **Procedure goes testing antimicrobial agents in Agar measures: theoretical considerations.** Antibiotics in Laboratory Medicine. Baltimore: Williams & Williams, 1986. p. 13.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by the standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493 – 496. 1966

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P.; Flavonóide Quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alim. Nutr**, v.15, n.13, p.285-292, 2004.

BERG, J. M. T.; LUBERT, J. **Bioquímica.** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 545p, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI document M44-A2 Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline. 2nd ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. M27-S44 th Ed. 2012.

GICHNER, T.; POSPÍŠIL, F.; VELEMÍNSKÝ, J.; VOLKEOVA, V.; VOLKE, J. Two types of antimutagenic effects of gallic and tannic acids towards N-nitroso-compounds-induced mutagenicity in the Ames Salmonella Assay. **Folia microbiologica**, v. 32, n. 1, p. 55-62, 1987.

GOMES, E.C.B.S. Evaluation of Antioxidant and Antiangiogenic Properties of *Caesalpinia echinata* Extracts. **Journal of Cancer**, v.5, n.2, p.143-150, 2014.

GRANGEIRO, A.R.S. **Avaliação do potencial toxicológico e farmacológico das folhas de *Caesalpinia echinata* Lam.** 2009. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco. 2009.

HAIDA, K. S.; PARZIANELLO, L.; WERNER, S.; GARCIA, D. R.; INÁCIO, C. V. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 11, n.3, p. 185-192, 2007.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for

the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027–1031, 2002.

KIM, D. O.; LEE, K. W.; LEE, H. J.; LEE, C. Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 50, n.13, p. 3713-3717, 2002.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN-JR, W. C. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. México: J. B. Lippincott Co. 1997, 570p.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica**. 9. Ed. Rio de Janeiro: Sarvier, 1104p, 2002.

LARONE, D.H. Culture and identification of Dermatophytes. **Clinical Microbiology Newsletter**. V. 18, n. 5, p. 33-40, 1996

LOCATELLI, C.; FILIPPIN-MONTEIRO, F. B.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: a review. **Eur J Med Chem**, v. 60, n.1, p. 233-9, 2013.

NCCLS-National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-Difusão**, Norma M2-A8, 8 ed. V.23, n.1, p. 1-54, 2003.

NCCLS- National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Método de Referência para Diluição de Caldo Teste de Susceptibilidade Antifúngica de Fungos Filamentosos**, norma M38-A2, 2 ed. V. 28, n16, p 1- 62. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

PERES, N.T.A.; MARANHÃO, F.C.A.; ROSSI, A.; MARTINEZ-ROSSI, N.M. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n.5, p.657-667, 2010.

PORTILHO, D.R.; DE MELO, I.A.; GUERRA, R.C.; BATISTA, H.L.; FERNANDES, C.H.C. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica da própolis produzida no estado do Tocantins. **Revista Científica do ITPAC**, v.6, n.2, 8p, 2013.

REGASINI, L. O. et al. Antimicrobial activity of *Pterogyne nitens* Tul., Fabaceae, against opportunistic fungi. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 706–711, 2010.

REICHLING, J.; SCHNITZLER,P.; SUSCHKE, U.; SALLER,R. Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties –an Overview. **Forsch Komplementmed**, v.16, n. 2, p. 79-90, 2009.

RODRIGUES, K. A. D. F.; DIAS, C. N.; FLORÊNCIO, J. C.; VILA NOVA, C. M.; GONÇALVES, J. D. R. S.; COUTINHO-MORAES, D. F. Prospecção Fitoquímica e atividade moluscicida de folhas de *Momordicacharantia* l. **Cadernos de Pesquisa**, v. 17, n. 2, 2010.

SILVA, D.I.S. **Avaliação de bioensaio das sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (*in vivo* e *in vitro*)**. 2012. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco. 2012.

XAVIER, Y.K.S.; SOBREIRA, R.C.B.; DA SILVA JÚNIOR, J.B.; DOS SANTOS, E. R.S.L.; LIMA, M.I.A.; FERREIRA, A.M.M.S.; DE SOUZA, C.S.V.; DE SOUZA, F.A.; DA SILVA, M.S.; DE SOUZA, I.A.; MAIA, C.S. Investigação Fitoquímica e Avaliação da Atividade Hemolítica e Toxicológica do extrato etanólico obtido da mistura de sementes e vagens de *Caesalpinia echinata* Lam. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n.3, p. 27341-27352, 2021.

YAN, T.; XU, M.; WAN, S.; WANG, M.; WU, B.; XIAO, F.; BI, K.; JIA, Y. Schisandrachinensis produces the antidepressant-like effects in repeated corticosterone-induced mice via the BDNF/TrkB/CREB signaling pathway. **Psychiatry Res.**, v. 243, p. 135–142, 2016.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R.C. The Dermatophytes. **Clinical microbiology reviews**, v.8, n.2, p. 240-259, 1995.