



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E MODO DE AÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO
DA FOLHA DE *Schinopsis brasiliensis* Engler, SOBRE ESPECIES DO
GÊNERO CÂNDIDA**

MONALYZA MYLLENA SILVA MONTEIRO LIMA

Campina Grande/PB

2016

MONALYZA MYLLENNA SILVA MONTEIRO LIMA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E MODO DE AÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO
DA FOLHA DE *Schinopsis brasiliensis* Engler, SOBRE ESPECIES DO
GÊNERO CÂNDIDA**

Dissertação Apresentada ao
Programa de Pós Graduação em
Odontologia da Universidade
Estadual da Paraíba, como requisito
para obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Cláudia Dantas de Medeiros

Campina Grande/PB

2016

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

L732a Lima, Monalyza Myllenna Silva Monteiro.
Atividade antifúngica e modo de ação do extrato etanólico da folha de *Schinopsis brasiliensis* Engler, sobre espécies do gênero *Candida* [manuscrito] / Monalyza Myllenna Silva Monteiro Lima. - 2016.
61 p. : il. color.
Digitado.
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2016.
"Orientação: Profa. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa".
1. Antifúngicos. 2. Plantas medicinais. 3. Candidíase bucal.
4. Medicamentos fitoterápicos. I. Título.

21. ed. CDD 615.321

MONALYZA MYLLENA SILVA MONTEIRO LIMA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E MODO DE AÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO
DA FOLHA DE *Schinopsis brasiliensis* Engler, SOBRE ESPECIES DO
GÊNERO CÂNDIDA**

Dissertação Apresentada ao Programa
de Pós Graduação em Odontologia
da Universidade Estadual da
Paraíba, como requisito para
obtenção do Título de Mestre.

DATA DA DEFESA: 28/07/2016

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro

Examinador Externo (UFPB)


Profa. Dra. Jozinete Vieira Pereira

Examinador Interno


Profa. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros

Orientadora e Presidente da Banca (UEPB)

Dedico esse trabalho aos meus pais, Marcos Antônio Monteiro Lima e Jovelina Silva Monteiro Lima. Que jamais deixaram de incentivar, por menor que fosse a contribuição, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. Obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** que iluminou o meu caminho durante esta caminhada, o que seria de mim sem a fé que eu tenho nele. Aos meus pais **Marcos Antônio** e **Jovelina**, por terem acreditado e investido em mim. Mãe, seu cuidado e dedicação foi que deram, em alguns momentos, a esperança para seguir. Pai, sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinha nessa caminhada.

Áos meus queridos irmãos **Morganna** e **Lucas** pelo carinho, apoio e incentivo. Obrigada por tudo!

A minha orientadora Professora Dra. **Ana Cláudia**, pelo aprendizado, atenção, disponibilidade e paciência comigo. Sou extremamente grata por todo conhecimento adquirido durante esses dois anos pelo seu conhecimento científico e principalmente pela grande professora, talentosa, detentora de um conhecimento intelectual enorme e deslumbrante como profissional. Admiro muito a sua competência e responsabilidade, um exemplo de profissional dedicada e competente. Meu muito obrigada!

A minha querida orientadora do estágio docência Professora Dra. **Jozinete Vieira**, pela pessoa maravilhosa, carinhosa, extremamente dedicada e detentora de uma paciência enorme, sempre muito atenciosa e educada, não só uma professora mas um ser humano que sabe se colocar no lugar do outro e que se preocupa com os alunos, eu admiro muito o seu lado profissional e pessoal, e sou extremamente grata por todo o aprendizado na sala de aula e clínica durante o estágio docência. Obrigada por tudo!

Ao professor Dr. **Ricardo Castro**, por sua atenção, apoio e disponibilidade em fazer parte dessa pesquisa, sempre muito educado e paciente. Sou grata pela sua contribuição e pelo auxílio científico e intelectual. Tenho uma enorme admiração pela sua pessoa enquanto profissional, pela sua competência e dedicação. Muito obrigada!

A Universidade Estadual da Paraíba, enquanto instituição formadora, por toda a contribuição disponibilizada para a minha formação durante a

Graduação e a Pós-Graduação, além do espaço cedido para realização da pesquisa, crescimento e desenvolvimento profissional.

Aos **professores do Programa de Pós Graduação em Odontologia da UEPB**, por terem compartilhado seus conhecimentos e pelo enriquecimento dado a esse programa com a presença de todos.

A todos os que fazem parte do **LABDEM (Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos)**, obrigada pela paciência, colaboração, atenção, contribuição intelectual e apoio para que essa pesquisa fosse realizada, agradeço a cada um de vocês por tudo, e peço desculpas por qualquer inconveniente e mal entendido, desde já agradeço imensamente a todos pela convivência durante esses dois anos. Meu muito obrigada!

Ao **Laboratório de Microbiologia Oral** da Universidade Federal da Paraíba, por ter cedido espaço para a realização de parte da pesquisa.

A todos os meus **colegas de turma**, obrigada por todos os momentos compartilhados ao longo desta caminhada.

A **CAPES** pela concessão da bolsa de estudos.

EPIGRAFE

**"Tudo tem o seu tempo determinado, e
há tempo para todo propósito debaixo do céu."**

Eclesiastes 3.1

RESUMO

Introdução: A Utilização de produtos naturais como alternativa terapêutica tem se tornado bastante promissora no tratamento de várias doenças nos últimos anos, com essa perspectiva, os agentes que ocorrem naturalmente se destacam como uma fonte de moléculas bioativas com potencial aplicação terapêutica nas áreas médicas e odontológicas. **Objetivo:** O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antifúngica e o modo de ação do extrato etanólico da folha de *Schinopsis brasiliensis* Engler sobre espécies do gênero *Candida*. **Material e Métodos:** O material vegetal foi coletado no município de Campina Grande –PB, em seguida foi realizada a preparação do extrato, para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM). Foi realizado o screening fitoquímico para a quantificação dos constituintes químicos, em seguida foi feito um teste para verificar o possível mecanismo de ação, se por via parede celular ou membrana plasmática. **Resultados:** Os valores de CIM/ CFM para o extrato etanólico de *S. brasiliensis* (Braúna) variaram de 31,25 a 250 µg/mL, sobre as cepas *C. albicans* ATCC 60193, *C. krusei* ATCC 34135, *C. tropicalis* ATCC 705, *C. albicans* ATCC 18804, *C. albicans* CBS 562 e *C. tropicalis* CBS 94. Quanto ao modo de ação, a ação antifúngica de *S. brasiliensis* (Braúna), parece estar relacionada com a permeabilidade iônica da membrana celular. O extrato exibiu uma maior quantidade de polifenóis totais, seguida de saponinas totais em sua composição, que estão diretamente relacionados com a atividade antifúngica do extrato. **Conclusão:** O extrato de *S. brasiliensis* apresenta uma forte atividade antifúngica, atuando, provavelmente, na permeabilidade iônica da membrana celular fúngica.

Descritores: Antifúngicos; Planta medicinal; Candidíase bucal.

ABSTRACT

Introduction: The use of natural products as an alternative therapy has become very promising in the treatment of various diseases in recent years, with this perspective; the agents that occur naturally stand out as a source of bioactive molecules with potential therapeutic application in the medical and dental fields. **Objective:** The objective of this study was to evaluate the antifungal activity and the ethanol extract mode of action of *Schinopsis brasiliensis* Engler sheet on the *Candida* genus. **Methods:** The plant material was collected in the city of Campina Grande -PB then was held to prepare the extract, for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC). We conducted the phytochemical screening for the quantification of chemical constituents, then a test was made to verify the possible mechanism of action, whether via mobile or plasma membrane wall. **Results:** The MIC / MFC values for the ethanolic extract of *S. brasiliensis* (Braúna) ranged from 31.25 to 250 ug / ml on strains ATCC 60193 *C. albicans*, *C. krusei* ATCC 34135, *C. tropicalis* ATCC 705 *C. albicans* ATCC 18804, *C. albicans* and *C. tropicalis* CBS 562 94. CBS As for the mode of action, antifungal action *S. brasiliensis* (Braúna) seems to be related to the ionic permeability of the cell membrane. The extract exhibited an increased amount of total polyphenol, total saponins then in its composition, which are directly related to the antifungal activity of the extract. **Conclusion:** The extract of *S. brasiliensis* has a strong antifungal activity, acting probably in the ionic permeability of the fungal cell membrane.

Keywords: Antifungals; Medicinal plant; oral candidiasis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Candidose pseudomembranosa em língua.....	21
Figura 2. Candidose eritematosa no palato.....	21
Figura 3. Foto da <i>Schinopsis brasiliensis</i>	25
Figura 4. Locais identificados de ocorrência natural de <i>S. brasiliensis</i> , no Brasil.....	26
Figura 5. Efeitos de diferentes concentrações do ergosterol (100 – 400 µg/mL) na CIM da <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engler sobre <i>Candida albicans</i> CBS 562 and <i>Candida albicans</i> ATCC 18804.....	34
Figura 6. Efeito de diferentes concentrações do ergosterol (100 – 400 µg/mL) na CIM da Nistatina sobre <i>Candida albicans</i> CBS 562 e <i>Candida albicans</i> ATCC 18804.....	40
Figura 7. Concentração de metabólitos secundários de <i>S. brasiliensis</i>	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Atividade antifúngica da <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engler sobre <i>Candidas</i> spp. CIM e CFM valores expressos em µg/mL.....	37
Tabela 02. Efeitos da presença do Sorbitol na CIM da <i>Schinopsis brasiliensis</i> (Valores expressos em µg/mL).....	39
Tabela 03. Caracterização fitoquímica do extrato de <i>S. brasiliensis</i>	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASD- Ágar Sabouraud Dextrose

ATCC- American Type Culture Collection

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CBS- *Central Bureau Voor Schimmelcultures*, Coleção Holandesa de Cepas Fúngicas.

CIM (MIC) – Concentração Inibitória Mínima

CFM (MFC) – Concentração Fungicida Mínima

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CSD- Caldo Sabouraud Dextrose

DMSO- Dimetilsulfóxido

EB- Extrato Bruto

LABDEM- Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos

UEPB- Universidade Estadual da Paraíba

OMS- Organização Mundial da Saúde

CIM- Concentração Inibitória Mínima

CFM- Concentração Fungicida Mínima

C.a ou C. *albicans*- *Candida albicans*

C.k ou C. *krusei*- *Candida krusei*

C.t ou C. *tropicalis*- *Candida tropicalis*

mL- mililitro

µL- microlitro

g- grama

mg- miligrama

µg- micrograma

EE- Extrato Etanólico

MF- Medicamento Fitoterápico

MDR- Multidrogas resistentes

MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

PNPIC- Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Público de Saúde

PNPMF- Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

S. brasiliensis- *Schinopsis brasiliensis Engler*

UFC- Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1 CANDIDOSE BUCAL.....	20
2.2 MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS.....	23
2.3 <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engler	24
2.4 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA <i>Schinopsis brasiliensis</i>	26
3. OBJETIVOS.....	28
3.1 OBJETIVO GERAL.....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4. METODOLOGIA.....	30
4.1 MATERIAL VEGETAL E PREPARAÇÃO DO EXTRATO.....	30
4.2 SCREENING FITOQUÍMICO.....	30
4.2.1 Determinação do teor de polifenóis totais.....	30
4.2.2 Determinação do teor de flavonóides totais.....	31
4.2.3 Determinação do teor de saponinas totais.....	31
4.2.4 Determinação do teor de taninos condensados.....	32
4.3 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	32
4.4 CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA.....	34
4.5 VERIFICAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DO EXTRATO DE <i>S. brasiliensis</i> SOBRE A PAREDE CELULAR FÚNGICA.....	34
4.6 VERIFICAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DO EXTRATO DE <i>S. brasiliensis</i> SOBRE A MEMBRANA CELULAR FÚNGICA.....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1 DETERMINAÇÃO DOS VALORES DA CIM E CFM.....	37

5.2 MODO DE AÇÃO DO EXTRATO DE <i>S. brasiliensis</i>	39
5.3 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO DE <i>S. brasiliensis</i>	42
6 CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS.....	51

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas são as principais causas de mortes prematuras no mundo, sendo estimado 15 milhões de óbitos por ano. O crescimento da resistência microbiana é um fator importante na ocorrência deste quantitativo de mortes, além de que, esta ameaça também dificulta a cura e eleva os gastos com a assistência à saúde (WHO, 2008). Na procura de novas alternativas para tratar as infecções por fungos, interessa a descoberta de novos produtos de origem vegetal ou de síntese (SARAIVA et al., 2013).

Na primeira metade do século passado, foram descobertas diversas drogas antimicrobianas. Todas elas ampliaram notavelmente o espectro de enfermidades infecciosas que se podiam prevenir ou curar. Apesar da rapidez com que se introduzem novos agentes antimicrobianos, os microrganismos têm demonstrado uma grande capacidade para desenvolver resistência a esses fármacos, tornando-os menos eficientes (CHAVES et al., 2011).

A candidose oral é uma infecção fúngica oportunista comum da cavidade oral, com taxas de prevalência e incidência variando de 25% a 75% em todo o mundo aumentando nas últimas décadas, particularmente entre as populações de indivíduos HIV-imunocomprometidos e hospitalizados (GARCIA-CUESTA et al., 2014; PEREZOUS et al., 2005).

O arsenal limitado de drogas antifúngicas para o tratamento da candidose oral inclui principalmente polienos, azóis e equinocandinas (DIMOPOULOS et al., 2013). No entanto, estes medicamentos têm índice terapêutico estreito, baixa biodisponibilidade, absorção e efeitos secundários graves como: irritação gástrica, resistência microbiana, enjoo, gosto margo dentre outros (HAMILL, 2013). Além disso, o uso excessivo e indiscriminado de agentes antifúngicos favorece o desenvolvimento de cepas resistentes (WILLE et al., 2013). Embora a *Candida albicans* tenha sido relatada com menor resistência a drogas antifúngicas que outras espécies de *Candida*, resistência a azoles e equinocandinas tem sido encontrada (SILVA-ROCHA et al., 2015).

A utilização de produtos naturais como alternativa terapêutica tem se tornado bastante promissora no tratamento de várias doenças nos últimos

anos, com essa perspectiva, os agentes que ocorrem naturalmente se destacam como uma fonte de moléculas bioativas com potencial aplicação terapêutica nas áreas médicas e odontológicas, isso pode ser explicado devido ao grande aumento da resistência microbiana encontrada atualmente com o tratamento a base dos medicamentos convencionais (SILVA-ROCHA et al., 2015).

O aumento da resistência de fungos patogênicos às drogas antifúngicas utilizadas atualmente, tem ocasionado uma necessidade de prevenção de infecções fúngicas orais a partir do desenvolvimento de terapias alternativas (TSANG, BANDARA, FONG, 2012). Diante disso foi escolhida a *Schinopsis brasiliensis* Engler, como terapia alternativa no combate a infecção fúngica oral, por que segundo a literatura ela apresenta um excelente potencial antimicrobiano, antioxidante e antifúngico e por ser uma planta de uso popular no tratamento de várias doenças tais como febre, tosse, diarreia e como anti-séptico para tratar feridas. Além disso, poucos estudos têm sido realizados com as partes da *Schinopsis brasiliensis* Engler, como folhas, cascas, caules.

Diante disso o objetivo desse trabalho foi analisar a atividade antifúngica do extrato etanólico da casca de *Schinopsis brasiliensis* Engler e o mecanismo de ação sobre a permeabilidade da membrana.

REFERENCIAL
TEÓRICO

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CANDIDOSE ORAL

Candida albicans é um importante microrganismo na patogênese da candidose e está presente na microbiota normal da cavidade oral. No entanto, a transição de condições normais da mucosa a uma situação patológica pode ocorrer quando houver um parasitismo que leve a um desequilíbrio entre o hospedeiro e o fungo, o que pode levar para o início da candidose oral. Os fatores predisponentes para a candidose oral e estomatite protética incluem, deficiências imunológicas, redução do fluxo salivar, largo espectro de uso de antibióticos, mal uso da prótese, tabagismo e má higiene oral (SILVA-ROCHA et al., 2015)

O gênero *Candida* contém cerca de 200 espécies, porém a *Candida albicans* é a principal causadora da candidose oral. Esse microrganismo é encontrado na mucosa oral e produz diversas biomoléculas que garantem sua adesão à mucosa. Por essa razão, o tratamento recomendado é aquele que emprega agentes terapêuticos que entram em contato direto com a mucosa bucal. (TALLURY et al., 2007).

A candidose pode se apresentar de diversas formas clínicas dentre estas estão a candidose eritematosa, pseudomembranosa, hiperplásica, entre outras, sendo as mais comuns a candidose pseudomembranosa e a eritematosa, exemplificadas adiante nas figuras 1 e 2 respectivamente. A Candidose eritematosa se apresenta em torno de mancha com coloração vermelha e com sintomatologia representada pela sensação de queimação. A Forma pseudomembranosa apresenta-se como placas de coloração branca, cremosas, destacáveis e com a presença de hálito fétido. A candidose é comumente provocada por espécies do tipo *Candida albicans*, embora outras espécies, como *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida stellatoidea* e *Candida pseudotropicalis*, tenham sido identificadas (SANTOS et al., 2014).

Figura 1: Candidose Pseudomembranosa na Língua.



Fonte: (Patil et al., 2015)

Figura 2: Candidose Eritematosa no Palato.



Fonte: (Patil et al., 2015)

O tratamento da candidose oral é baseada em quatro fundamentos: fazer um diagnóstico precoce e preciso da infecção; corrigir os fatores predisponentes ou doenças subjacentes; avaliar o tipo de *Candida* infectáveis e a relação eficácia/toxicidade em cada caso (WILLIAMS,; LEWIS, 2011; MARTÍNEZ-BENEYTO, 2010). E deve ser específico para cada paciente, de acordo com o seu estado de saúde, a apresentação clínica e a gravidade da infecção, a possibilidade de cooperação, dor bucal e a capacidade de usar um gel ou solução (SILVERMAN et al., 2014).

Na candidose oral, uma das formas de tratamento é a higienização por realçar a eficácia da droga e o emprego de agentes tópicos. O tratamento tópico como por ex: Nistatina, Miconazol e Cetoconazol é recomendado como a primeira opção no tratamento da candidose oral sem complicações, e após a terapia sistêmica dos casos mais graves dessa enfermidade. (AKPAN, MORGAN, 2002).

Dentre os vários fármacos disponíveis para o tratamento tópico da candidose oral, a nistatina apresenta ação antifúngica pronunciada, já que interage com o ergosterol presente na membrana plasmática de células fúngicas, provocando perda de íons e moléculas vitais para sobrevivência celular. Entretanto, a nistatina possui um sabor extremamente desagradável, que muitas vezes causa o abandono do tratamento pelos pacientes, além de apresentar restrição aos pacientes diabéticos e também irritar o estômago. (SHIP et al., 2007).

Outros antifúngicos disponíveis comercialmente também são utilizados para tratar a infecção oral por *Candida*, incluindo anfotericina B, clotrimazol, miconazol, itraconazol, fluconazol, cetoconazol dentre outros. No entanto, apesar da sua eficácia, estas drogas podem produzir efeitos adversos, tais como: gosto amargo, reações alérgicas, e interações medicamentosas (FERREIRA et al., 2015). Em relação ao mecanismo de ação desses antifúngicos a anfotericina B liga-se às membranas celulares e interfere na permeabilidade e nas funções de transporte, os demais antifúngicos da família dos azóis, inibem as enzimas P450 fúngicas (por exemplo, a esterol desmetilase) responsáveis pela síntese do ergosterol, o principal esterol encontrado na membrana das células fúngicas. A consequente depleção de

ergosterol altera a fluidez da membrana, interferindo na ação das enzimas associadas à membrana. (GOLAN et al., 2009).

Na candidose oral, uma das formas de tratamento é a higienização por realçar a eficácia da droga e o emprego de agentes tópicos. O tratamento tópico é recomendado como a primeira opção no tratamento da candidose oral sem complicações, e após a terapia sistêmica dos casos mais graves dessa enfermidade. (AKPAN, MORGAN, 2002).

2.2 MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS

Os Medicamentos Fitoterápicos (MF) são produtos industrializados utilizados no Brasil (CARVALHO et al., 2008), e de acordo com a legislação sanitária brasileira são definidos como medicamentos formados exclusivamente por princípios ativos vegetais (BRASIL, 2004a), caracterizados pela sua eficácia, constância dos efeitos terapêuticos e qualidade (KLEIN et al., 2009). O Brasil tem uma rica história de uso das plantas medicinais no tratamento dos problemas de saúde da população, uso este construído com base na experiência e transmitido de forma oral através da cultura popular (BRUNING et al., 2012).

O Brasil, em 2006, aprovou duas políticas públicas que favorecem o uso dos medicamentos fitoterápicos pela população, através da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Público de Saúde (PNPIC) e da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), através da Portaria 971/2006 e do Decreto 5813/2006, respectivamente (ANVISA, 2012; BRASIL). Existem muitas formas de produção de Medicamentos fitoterápicos no Brasil que pode ser destinado para uso humano ou veterinário e sua regulamentação pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), respectivamente (ANVISA, 2012).

Neste sentido, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS, promove a ampliação das opções terapêuticas ofertadas aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), com garantia de acesso à plantas medicinais e fitoterápicos, com segurança, eficácia e qualidade, nos diferentes níveis de

complexidade do Sistema, com ênfase na atenção básica, por meio de ações de prevenção de doenças e de promoção e recuperação da saúde é uma importante estratégia, com vistas à melhoria da atenção à saúde da população e à inclusão social. (BRASIL, 2006).

As doenças infecciosas estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, com HIV, tuberculose e malária sendo os mais envolvidos. Apesar dos progressos realizados no entendimento de microrganismos e seu controle em nações industrializadas, devido a incidência de microrganismos resistentes e a persistência da doença, isso tem se tornado um enorme problema de saúde pública (DJOUOSSI et al., 2015). Além disso, o desenvolvimento de drogas sintéticas abrandou como um resultado da resistência à droga. Por conseguinte, tal fato criou um novo interesse renovado na busca de novas drogas, a fim de combater a resistência (SHAH, 2005).

A necessidade de novos medicamentos, eficazes e acessíveis para o tratamento de doenças microbianas é um dos principais problemas enfrentados pela saúde global de hoje. As plantas foram usadas como uma fonte de novos compostos medicinais ao longo da história e continuam a servir como a base para muitos dos fármacos utilizados hoje em dia. Nas últimas décadas, muitos estudos têm sido realizados em diferentes espécies de plantas para descobrir compostos de possível interesse para medicina (CRAGG, 2009).

Produtos naturais, obtidos a partir de várias fontes como plantas, animais e microrganismos são considerados fortes candidatos de alternativas de tratamento, desde longo período de tempo e essas constituem a maioria dos agentes quimioterápicos atualmente em uso para vários tipos de doenças infecciosas provocadas por bactérias patogênicas e fungos, doenças cardiovasculares, cancro e muitos outros. (COUTINHO et al., 2010; VERAS et al., 2012).

O interesse em utilizar Plantas medicinais extratos e seus componentes isolados aumentou não só nos países em desenvolvimento, mas também obtendo mais popularidade em países desenvolvidos. Com base nisso, plantas medicinais seria uma boa fonte para obtenção de novos compostos químicos, com atividade farmacológica e menos toxicidade (MEDEIROS et al., 2007).

Portanto, os estudos a partir das plantas são importantes e devem ser investigados para uma melhor compreensão da sua composição química, dos seus constituintes bioativos, eficácia e segurança. (SILVA et al., 2012).

2.3 *Schinopsis brasiliensis* Engler.

É uma planta pertencente à família Anacardiaceae, nativa do nordeste do Brasil. A *S. brasiliensis*, conhecida popularmente como braúna, “baraúna”, “braúna-do-sertão”, “braúna-parda”, “quebracho” “chamacoco” e “chamucoco” (CARVALHO, 2011). É uma planta pertencente ao bioma da Caatinga, amplamente utilizada pelas comunidades tradicionais, sua imagem pode ser visualizada adiante na figura 3. Dentre suas propriedades terapêuticas, pesquisas têm demonstrado sua eficácia no combate a microrganismos. Tendo o seu potencial antimicrobiano sido relatado na literatura (SARAIVA et al., 2013).

Figura 3. Foto da *Schinopsis brasiliensis* Engler.



Fonte: (CARVALHO, 2008)

Diversas partes de *S. brasiliensis* (folha, casca, tronco e fruto) veem sendo utilizadas na medicina tradicional por atuar como anti-inflamatórios para várias doenças, como gripe, tosse, febre e fraturas ósseas (ALMEIDA et al., 2005; ALBUQUERQUE, 2006; ALBUQUERQUE et al., 2007), anti-histéricas, antidiarreicas, no combate a hemorragias uterinas e neurastenia (GONZAGA et al., 2003, DANTAS, 2008), nas zoonoses, impotência sexual (ALMEIDA et al. 2005; ALBUQUERQUE et al; 2007; SARAIVA et al., 2011), lesões e micoses na pele, devido ao seu recorrente caráter antisséptico (DANTAS, 2008).

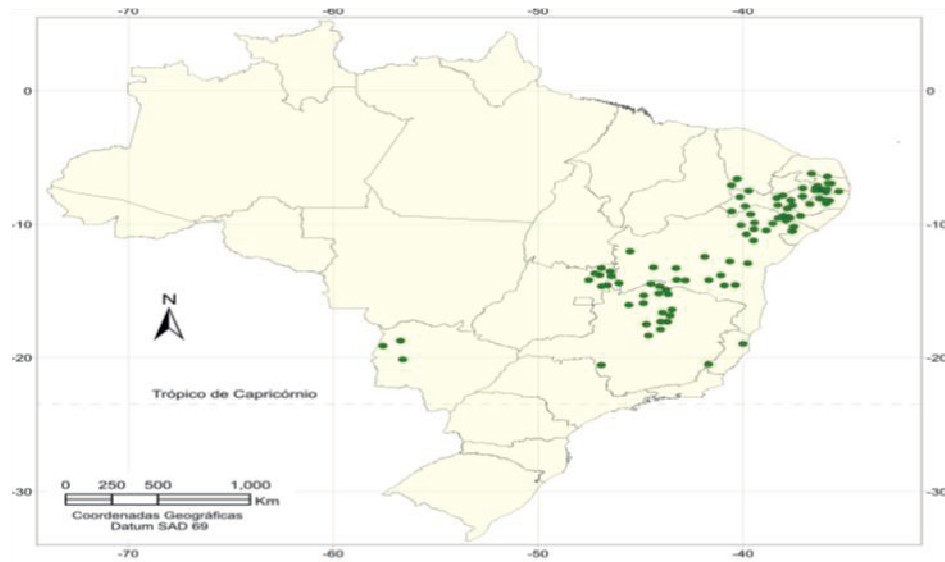
Segundo Chaves et al. (2011) o extrato hidroalcoólico das folhas de *S. brasiliensis*, apresenta potencial antimicrobiano frente a *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, e a alcoolatura frente a *S. aureus*. Enquanto que, Saraiva et al. (2011) ao testarem o extrato metanólico das folhas, verificaram efeito antimicrobiano frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. penumoniae*, *Escheria coli*, *Salmonella*; *Enterococcus fecalis*, *C. krusei* e *C. albicans*, principalmente frente *S. aureus*, *P. aeruginosa*, as quais estão entre as bactérias mais encontradas em infecções nosocomiais.

2.2 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA *S. brasiliensis*.

A *S. brasiliensis* é encontrada no Cerrado, Floresta Estacional Semidecidual, e Caatinga, ANDRADE et al. 2009), sendo de grande valor econômico para a região nordestina (SARAIVA 2007).

No Brasil é encontrada na Bahia (LIMA 1998, RAMALHO et al. 2009) Ceará, Pernambuco (NASCIMENTO 2003; ALVAREZ 2010, CALIXTO 2011, BARBOSA et al. 2014), Distrito Federal (SILVA 2004), Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe, Tocantins, Espírito Santo, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais (SANTOS 2007, SANTOS et al. 2008), Goiás (LIMA et al. 2008) e Paraíba (SILVA et al. 2004; TROVÃO et al. 2004; LACERDA 2007; OLIVEIRA et al. 2009, SANTOS 2010). Apresenta também ocorrência internacional como é o caso da Bolívia e Paraguai (WILLIAMS 2001, OLIVEIRA 2009). Na figura 4 é possível visualizar os locais mais frequentes de sua ocorrência no Brasil.

Figura 4. Locais identificados de ocorrência natural de Braúna-do-sertão (*Schinopsis brasiliensis*), no Brasil.



Fonte: (CARVALHO, 2008)

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.3 OBJETIVO GERAL

- ✓ Avaliar a atividade antifúngica do extrato etanólico da casca de *S. brasiliensis* Engler sobre espécies de *Candida*.

2.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Preparar o material vegetal para extração.
- ✓ Obter o extrato etanólico de *S. brasiliensis* Engler.
- ✓ Determinar o perfil fitoquímico do extrato de *Schinopsis brasiliensis*.
- ✓ Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM), do extrato de *S. brasiliensis* frente a espécies de *Candida*.
- ✓ Realizar o mecanismo de ação do extrato de *Schinopsis brasiliensis* frente a espécie de *Candida albicans*.

METODOLOGIA

3. METODOLOGIA

3.1 MATERIAL VEGETAL E PREPARAÇÃO DO EXTRATO

As cascas de *S. brasiliensis* foram coletadas no município de Campina Grande-PB (7° 13' 50" S, 35° 52'52" W) e a identificação foi feita no Herbário "Jaime Coelho de Moraes" na Universidade Federal da Paraíba, sob o número EAN-14049. Em seguida o material foi seco em estufa de circulação forçada de ar a 40 °C, até obter peso constante e pulverizado em moinho de facas com saída de 10 mesh.

O extrato etanólico (EB) foi obtido por percolação do pó da casca, utilizando o etanol como solvente por cinco dias, em três ciclos, e concentrado em evaporador rotativo à vácuo (40 °C, 55 RPM) até total remoção do solvente.

3.2 SCREENING FITOQUÍMICO

3.2.1 Determinação do teor de polifenóis totais

Para a determinação do teor de polifenóis totais, utilizou-se o método descrito por CHANDRA e MEJIÁ (2004). Dessa forma, adicionou-se 1 mL da solução aquosa do extrato a 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 1N, e esta mistura permaneceu em repouso por 2 minutos. Em seguida, adicionou-se 2 mL de uma solução aquosa de Na₂CO₃ a 20% (p/v), e a mistura permaneceu em repouso por mais 10 minutos. Em seguida, foi feita a leitura da absorbância a 757 nm em espectrofotômetro (Shimadzu® UV mini – 1240), contra um branco composto por água destilada, reagente de Folin-Ciocalteu e solução a 20% de Na₂CO₃.

Para a obtenção da curva analítica, uma solução padrão de 100 µg/mL de ácido gálico foi preparada pela dissolução de 10 mg do padrão em 100 mL de água destilada. A partir dessa solução foram feitas diluições em triplicata, de forma a obter soluções de 1, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 35, e 40 µg/mL. A

concentração de polifenóis foi expressa em miligramas equivalentes de ácido gálico. As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.2. Determinação do teor de flavonoides totais

A determinação do conteúdo de flavonóides totais seguiu o método de MEDA et al. (2005). A 5 mL de cada solução (em metanol) do extrato foi adicionado o mesmo volume de uma solução (em metanol) de $AlCl_3$ a 2% (p/v). A mistura permaneceu em repouso por 10 minutos antes da leitura da absorbância a 415 nm, contra um branco composto pela solução de $AlCl_3$.

A curva de calibração foi obtida a partir de uma solução padrão a 100 $\mu g/mL$, preparada pela dissolução de 10 mg de quercetina em 100 mL de metanol. A partir dessa solução, foram feitas diluições em triplicata, obtendo-se soluções de quercetina nas concentrações de 2, 4, 6, 8, 10, 13, 16, 19, 22, 26, 28 e 30 $\mu g/mL$. A concentração de flavonóides foi expressa em miligramas equivalentes de quercetina. As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.3. Determinação do teor de saponinas totais

A quantificação de saponinas totais seguiu o método descrito por MAKKAR, SIDDHURAJU e BECKER (2007). Adicionou-se 250 μL de uma solução de vanilina (8% em etanol) a 250 μL da solução do extrato (em metanol 80%), em seguida, adicionou-se 2,5 mL de sulfúrico (72%). Os tubos foram incubados a 60 °C em banho-maria por 10 minutos, sendo transferido para um banho de gelo, onde permaneceram por 4 minutos. Foi feita a leitura da absorbância a 544 nm, contra um branco composto pela solução de vanilina, metanol 80% e ácido sulfúrico.

A curva de calibração foi obtida a partir de uma solução padrão a 500 $\mu g/mL$, preparada pela dissolução de 10 mg de disogenina em 20 mL de metanol a 80%. A partir dessa solução, foram feitas diluições em triplicata, obtendo-se soluções de quercetina nas concentrações de 100, 200, 300, 400 e 500 $\mu g/mL$. A concentração de saponinas totais foi expressa em miligramas equivalentes de disogenina. As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.4. Determinação do teor de taninos condensados

O teor de taninos condensados foi quantificado utilizando-se o método de MAKKAR e BECKER (1993), no qual 0,5 mL da amostra do extrato vegetal foi adicionado a 3 mL de uma solução de vanilina (4% p/v em metanol); em seguida, adicionou-se 1,5 mL de HCl concentrado (37%). A reação ocorreu em tubos de ensaio, mergulhados em água a cerca de 22 °C. A leitura foi feita a 500 nm, contra um branco composto pela solução de vanilina, HCl e uma solução de etanol 50% (v/v) em água.

A curva de calibração para este ensaio foi obtida a partir de uma solução padrão de catequina obtida pela dissolução de 10 mg do padrão em 100 mL de metanol. A partir dessa solução, foram realizadas diluições em triplicata, de forma a obter soluções de catequina nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 µg/mL. A concentração de taninos condensados foi expressa em miligramas equivalentes de catequina. As análises foram realizadas em triplicata.

4.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A CIM foi determinada pela técnica de microdiluição em Caldo Sabouraud Dextrose (CSD), de acordo com protocolo proposto pela CLSI (2002), no qual foi avaliada atividade antifúngica do extrato de *S. brasiliensis*, a uma concentração inicial de 2.000 µg/mL, frente a cepas fúngicas do gênero *Candida* da coleção ATCC (American Type Culture Collection) – *C. albicans* ATCC 60193; *C. tropicalis* ATCC 705; *C. krusei* ATCC 34135; *C. albicans* ATCC 18804 – e da coleção holandesa CBS – Central Bureau voor Schimmelcultures (Escritório Central de Culturas de Fungos): *C. albicans* CBS 562, *C. tropicalis* CBS 94).

Para o preparo do inóculo, retira-se uma alíquota do fungo que estava congelado e reativa em 5ml de caldo sabouroud dextrose, deixando por 24h. Após 24h, retiram-se o equivalente a uma alça de platina desse caldo de fungos para plaquear em ágar sabouroud, de modo a observar ao final de 48h de incubação se cresceu o microrganismo e se o crescimento fora uniforme. Após isto retirou-se uma alíquota de fungos isolados da placa de petri e adiciona a 9ml de salina, ajusta no comprimento de onda de 580 nm e

absorbância de (0,08 a 1,0) em espectrofotômetro. Em seguida retira-se 1ml dessa solução já ajustada e adiciona em um tubo, contendo 9ml de salina. Em seguida retira-se 1ml desse tubo e acrescenta em outro tubo, contendo 9ml de caldo. E em seguida adiciona mais 5ml de caldo ao último tubo, obtendo portanto o inóculo. (CLSI, 2005).

Foram utilizadas microplacas de 96 poços. Inicialmente foram inseridos em cada poço 100 µL de Caldo Sabouraud Dextrose. A seguir, 100 µL da solução do extrato, preparado na concentração previamente mencionada, foram inseridos no primeiro poço de cada coluna e diluídos seriadamente através da retirada de uma alíquota de 100 µL da cavidade mais concentrada para a cavidade sucessora. Ao fim de cada coluna, a última alíquota retirada foi desprezada.

Após isto foram inseridos em cada poço 100 µL do inóculo da cepa fúngica com concentração final equivalente a $2,5 \times 10^3$ UFC/ML, preparado previamente. As placas foram incubadas em estufa por 48h a 30°C e, em seguida, realizada leitura visual dos resultados a partir da observação da formação de aglomerados de células fúngicas no fundo dos poços da placa.

Para confirmação da presença de microrganismos viáveis foram inseridos 50 µL do corante TCT (2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio) em cada poço da placa e a mesma incubada novamente em estufa por 24 h. O TCT é capaz de verificar a viabilidade das cepas através do mecanismo de respiração celular pela atividade das enzimas desidrogenases (DESWAL; CHAND, 1997). Neste sentido, na segunda leitura, os poços corados em vermelho foram considerados contendo microrganismos viáveis. A CIM foi considerada a menor concentração do produto em teste capaz de inibir o crescimento das cepas de leveduras utilizadas nos ensaios microbiológicos.

Os ensaios foram realizados em triplicata e a CIM calculada pela moda dos resultados das triplicatas. O controle positivo utilizado para este teste foi a nistatina (Sigma-Aldrich, São Paulo – SP), a uma concentração inicial de 12,5 µg/mL. Simultaneamente ao ensaio, foi realizado controle de viabilidade das cepas, controle de esterilidade do meio de cultura, controle do DMSO (Dimetilsulfóxido), utilizado para o preparo da solução de nistatina, e controle do tween 80, utilizado no preparo da emulsão do extrato.

4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

A partir dos resultados obtidos no ensaio para determinação da CIM, foram semeados 50 µL dos poços referentes a CIM e as duas concentrações imediatamente mais concentradas (CIM x 2 e CIM x 4) em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose. As placas foram incubadas em estufa a 30°C por 48h. A leitura visual foi realizada através da observação de crescimento fúngico no meio de cultura. Foi considerada CFM, a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível do subcultivo (CLSI 2002; RASOOLI; ABYANEH, 2004).

A relação CFM/CIM foi calculada de forma a determinar se a substância possui uma atividade fungistática ($CFM/CIM \geq 4$) ou fungicida ($CFM/CIM < 4$) (SIDDIQUI et al., 2013).

4.5 VERIFICAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DA SUBSTÂNCIA SOBRE A PAREDE CELULAR FÚNGICA

Foi realizada a técnica da microdiluição na presença de sorbitol, protetor osmótico, com o objetivo de verificar o possível mecanismo de ação do extrato de *S. brasiliensis*, sobre a parede celular de *C. albicans* (ATCC 60193 e CBS 562). A técnica foi realizada da mesma forma como descrita no item 4.3. Neste caso, o inóculo utilizado foi preparado com sorbitol a uma concentração final de 0,8 M. As placas foram incubadas em estufa a 30°C e as leituras foram realizadas após 24h e 48 h de incubação (ESCALANTE et al., 2008; LIMA et al., 2013).

Os controles positivos utilizados neste teste foram a caspofungina (Diacetato de caspofungina - Sigma-Aldrich, São Paulo – SP), a uma concentração inicial de 5 µg/mL, que possui comprovado mecanismo de ação sobre a parede celular fúngica (PERLIN, 2011). A CIM na presença de sorbitol foi considerada como a menor concentração da substância capaz de inibir visivelmente o crescimento fúngico.

4.6 VERIFICAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DA SUBSTÂNCIA SOBRE A MEMBRANA CELULAR FÚNGICA

O ensaio na presença de ergosterol exógeno (Sigma-Aldrich, São Paulo – SP) nas concentrações de 100, 200 e 400 µg/mL foi realizado através da técnica de microdiluição, semelhante à descrita no item 4.3. Os inóculos das cepas *C. albicans* (ATCC 60193 e CBS 562) foram preparados separadamente com meio de cultura acrescido de ergosterol nas três concentrações testadas. Cada concentração foi testada em triplicata. As placas foram incubadas em estufa a 30°C e as leituras realizadas após 48 h (ESCALANTE et al., 2008; LIMA et al., 2013).

Os controles positivos utilizados neste teste foram a nistatina, que possui ação comprovada sobre a membrana celular fúngica, através da ligação aos esteróides presentes na mesma, causando alteração na sua permeabilidade (PERLIN, 2011). Também foi realizado controle com etanol 96% e tween 80, utilizados no preparo das soluções de ergosterol. Da mesma forma que nos testes anteriores, foi considerada a CIM na presença de ergosterol a menor concentração da substância capaz de inibir visivelmente o crescimento fúngico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA.

Observa-se na tabela 1 os Valores de CIM e CFM. Para o extrato rotoevaporado da *S. brasiliensis*, a CIM e CFM variaram de 31,25 a 250 µg/mL. Os solventes utilizados na emulsão do extrato e nistatina (Tween 80 e DMSO 10%), não teve efeito no crescimento das estirpes fúngicas. O valor da CIM 100% foi definida como 250 µg/mL, porque a CIM foi determinada pela moda dos resultados, ou seja, o valor que mais se repetiu, como mostra a tabela 1.

Tabela 1. Atividade antifúngica do extrato da *S. brasiliensis* sobre *Candidas* spp. CIM e CFM valores expressos em µg/mL.

Cepas	<i>Schinopsis brasiliensis</i>			Nistatina		
	CIM	CFM	CFM/CIM Razão	CIM	CFM	CFM/CIM Razão
<i>C. albicans</i> ATCC 60193	31,25	125	4	0,375	0,375	1
<i>C. krusei</i> ATCC 34135	125	125	1	3	3	1
<i>C. tropicalis</i> ATCC 705	250	250	1	1,5	1,5	1
<i>C. albicans</i> CBS 562	31,25	31,25	1	0,375	0,375	1
<i>C. tropicalis</i> CBS 94	250	250	1	1,5	1,5	1
<i>C. albicans</i> 18804	250	250	1	0,375	0,375	1

No estudo de PEREIRA et al, (2014) foram encontrados valores da CIM equivalentes a $< 400 \mu\text{g/mL}$, $< 300 \mu\text{g/mL}$, $< 250 \mu\text{g/mL}$ e $< 50 \mu\text{g/mL}$, onde foi utilizado 4 isolados de *C. albicans*, tendo um desses isolados obtido resultado semelhante ao encontrado nesse estudo. Cartaxo-Furtado et al, (2015) encontrou para *C. albicans* o valor da CIM de $250 \mu\text{g/mL}$, obtendo portanto o mesmo valor encontrado no nosso estudo. Essa semelhança nos resultados pode estar associada com o método de extração utilizado que foi semelhante ao nosso.

Costa et al, (2009) encontrou para o seu estudo resultados diferentes do nosso, tendo sido observado para *C. albicans* $20,09 \mu\text{g/mL}$, *C. glabrata* $17,19 \mu\text{g/mL}$ e *C. tropicalis* $10,16 \mu\text{g/mL}$. Já para a concentração fungicida mínima foi observada valores para *C. albicans* de $32,14 \mu\text{g/mL}$, *C. glabrata* de $34,38 \mu\text{g/mL}$ e *C. tropicalis* de $20,31 \mu\text{g/mL}$, segundo os autores eles afirmam que a atividade antifúngica tem relação com a presença de taninos em sua composição.

Silva (2004) encontrou em seu estudo resultados também diferentes do nosso sendo para *C. albicans* a CIM de $125 \mu\text{g/mL}$, *C. glabrata* de $125 \mu\text{g/mL}$, *C. krusei* de $15,625 \mu\text{g/mL}$ e *C. tropicalis* de $31,25 \mu\text{g/mL}$, segundo esse estudo a atividade encontrada deve-se principalmente a presença de taninos e flavonoides. Esses resultados diferem do encontrado no nosso estudo, isso pode ser explicado pela época em que as plantas foram coletadas e pelo modo de extração que podem interferir nos compostos secundários e fitoconstituintes responsáveis pela ação da planta.

A razão CIM/CFM indicaram que o extrato tem um efeito fungistático sobre a cepa *C. albicans* ATCC e fungicida sobre as demais cepas.

Estudos tem mostrado que produtos naturais são considerados potenciais inibidores da atividade antimicrobiana quando a CIM apresentar valores igual ou menor que $500 \mu\text{g/mL}$ (DUARTE et al., 2007). E os resultados do nosso estudo mostram que os valores da CIM e CFM variaram de $31,25$ a $250 \mu\text{g/mL}$ o extrato de *S. brasiliensis* apresenta um forte efeito antifúngico.

5.2 MODO DE AÇÃO DO EXTRATO DE *S. brasiliensis*.

Os resultados exibidos na Tabela 2 confirmam que a atividade do extrato de *S. brasiliensis* está relacionada com a sua capacidade de atuação na parede celular fúngica, observados a partir do aumento da CIM na presença do sorbitol. Como controle positivo foi utilizado para este ensaio a caspofungina que segundo a literatura possui efeito sobre a parede celular dos fungos.

Tabela 2. Efeitos da presença do Sorbitol na CIM da *S. brasiliensis* (Valores expressos em µg/mL).

Concentração do extrato <i>S. brasiliensis</i> (µg/mL)	<i>Candida albicans</i> ATCC 18804	
	Sem sorbitol	Com sorbitol
	2000	-
1000	-	-
500	-	-
250	-	-
125	+	+
62.5	+	+
31.25	+	+

+: Presença de fungos; -: Ausência de fungos

Os ensaios para a determinação da CIM na presença de ergosterol em concentrações de 100, 200 e 400 µg/mL mostrou que o extrato de *S. brasiliensis*, também atua sobre a permeabilidade iônica da membrana celular das estirpes testadas, indicado pelos valores da CIM, na presença de diferentes concentrações de ergosterol mostradas na figura 5. Houve um efeito semelhante sobre a CIM da nistatina contra a *C. albicans* ATCC 18804 na presença de diferentes concentrações de ergosterol mostradas na figura 6.

Figura 5. Efeitos de diferentes concentrações do ergosterol (100 – 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) na CIM da *S. brasiliensis* sobre *Candida albicans* CBS 562 e *Candida albicans* ATCC 18804.

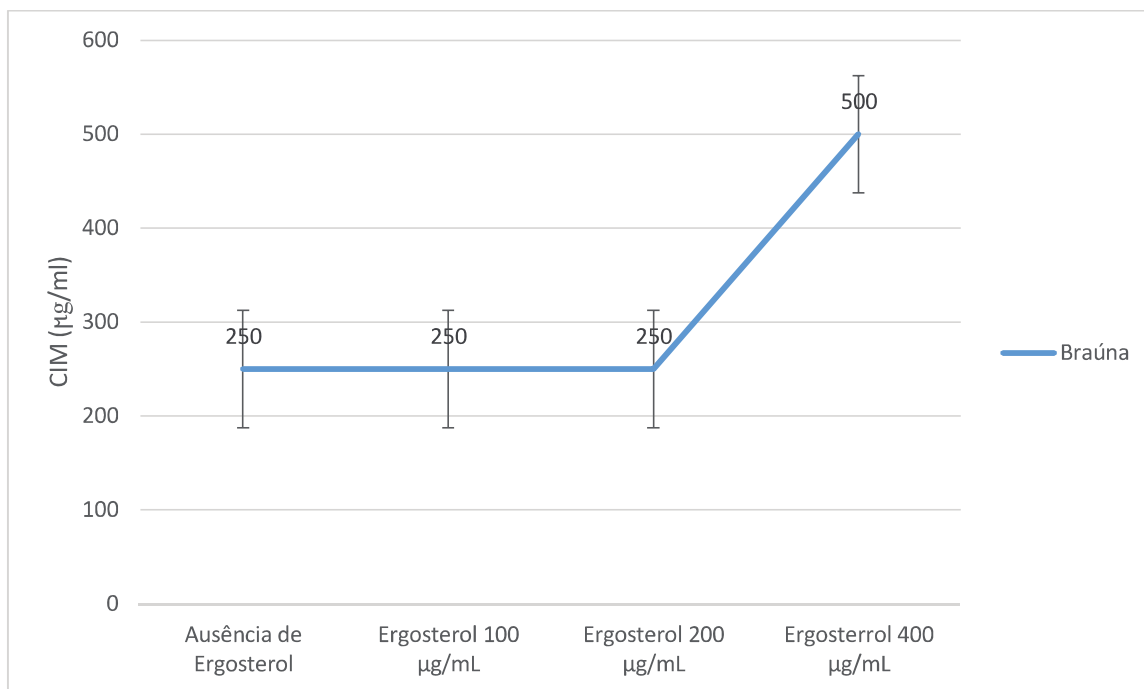
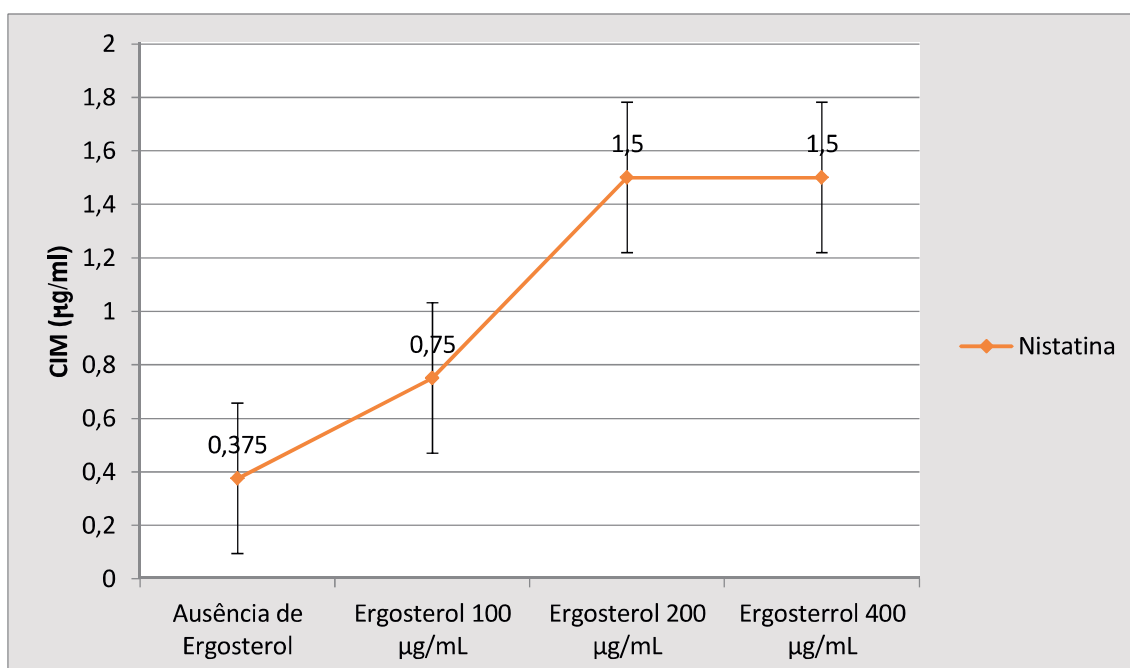


Figura 6. Efeito de diferentes concentrações do ergosterol (100 – 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) na CIM da Nistatina sobre *Candida albicans* CBS 562 e *Candida albicans* ATCC 18804



No estudo de Souza (2008), afirma que quanto ao modo de ação das substâncias, a maioria dos fármacos, antifúngicos convencionais atuam sobre a membrana plasmática do fungo, interferindo, na maioria das vezes, no metabolismo do ergosterol (p. ex. flucitosina, azóis, terbinafina). Um novo azol, o voriconazol, está sendo objeto de estudo clínico de fase III; possui ação fungistática contra todos os fungos, incluindo as cepas resistentes, sendo fungicida contra *Aspergillus*. É também pesquisada uma proteína do milho que aumenta a permeabilidade da membrana celular dos fungos.

No estudo de Peixoto (2015), a CIM na presença do sorbitol foi de 500 µg/mL tendo sido encontrado um valor superior ao nosso, mostrando mais uma vez que o nosso extrato possui uma forte atividade antifúngica atuando sobre a parede celular da célula fúngica e também agindo sobre a membrana celular já que foi observado um aumento da CIM na presença do ergosterol.

Os compostos antifúngicos de ocorrência natural exercem diferentes mecanismos de defesa nos vegetais. Os compostos fenólicos, proteínas, óleos essenciais e outros compostos podem atuar na inibição da biossíntese de componentes da parede celular como o glucan, a quitina, o ergosterol e as manoproteínas, destruindo a membrana e dificultando a entrada de nutrientes. Além de poder atuar inibindo a biossíntese de proteínas e aminoácidos fúngicos, na biossíntese de esfingolipídios e interferir no transporte de elétrons, inviabilizando a integridade da célula (BRUL e KLIS, 1999; MARINO, BERSANI e COMI, 2001). Os antifúngicos químicos exercem mecanismos similares, porém estes tendem a estar em quantidades excedentes e produzir residual tóxico em vista de que a adição nem sempre gera uma atuação específica e eficiente.

O estudo do modo de ação de antifúngicos é uma estratégia importante para limitar o aparecimento de resistência aos agentes atualmente disponíveis, bem como para o desenvolvimento de drogas mais seguras e mais potentes contra infecções fúngicas (LOPES et al. , 2013) . Além do primário mecanismos de ação dos antifúngicos (β - glucanas biossíntese de bloqueio e perturbação em síntese de ergosterol ou função) (PIERCE et al., 2013) , alguns agentes podem também ter efeitos sobre outros alvos, por exemplo, atividade

mitocondrial, que desempenha um papel na geração e regulação de espécies reativas de oxigênio (ROS), homeostase do cálcio e produção de ATP, todos relacionados com a viabilidade celular (SUN et al., 2013). Perante isto, sugerimos o estudo do extrato de *S. brasiliensis* em outros alvos estratégicos associados com a regulação de processos metabólicos nas células fúngicas, a fim de ter o seu potencial antifúngico exaustivamente elucidado.

5.3 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO DE *Schinopsis brasiliensis* ENGLER.

As plantas possuem compostos que não são essenciais à sua sobrevivência. Esses, por sua vez, são conhecidos por metabólitos secundários. Esses compostos são responsáveis por ajudarem na adaptação das plantas em ambientes onde se encontram, sendo responsáveis por fontes de substâncias biologicamente ativas (FUMAGALI, et al., 2008).

Admite-se que a maior parte das substâncias biologicamente ativas produzidas pelos vegetais, principalmente aquelas com propriedades antimicrobianas, são respostas fisiológicas do vegetal, na tentativa de adaptação às agressões provenientes do meio ambiente onde se encontram (COELHO et al., 2003). Dentre os constituintes químicos com provável ação antimicrobiana destacam-se taninos, flavonoides, fenóis, alcaloides, triterpenos, esteróis, derivados do ácido gálico, n-alquil-fenol e polifenóis (CARDOSO et al., 2005; BRASILEIRO, 2008). Na análise fitoquímica realizada nesse estudo foram identificadas e quantificadas a presença de alguns destes compostos.

Os valores apresentados na tabela 3 identificam a caracterização e a quantificação dos metabólitos secundários presentes no extrato *S. brasiliensis*, tendo sido observado uma maior quantidade de polifenóis totais (386,75 mg/g) os compostos fenólicos são responsáveis pela atividade antioxidante e combatem o envelhecimento celular (radicais livres), são responsáveis também pela proteção da planta contra patógenos, sendo bastante promissores as substâncias que o contenham em quantidades elevadas. (ROCHA et al., 2011).

Tabela 3. Caracterização fitoquímica do extrato de *S. brasiliensis*

Extrato	Taninos condensados (mg/g)	Flavonóides totais (mg/g)	Polifenóis totais (mg/g)	Saponinas totais (mg/g)
<i>S. brasiliensis</i> (folha)	13,16	70,03	386,75	171,37

Entre estes compostos, aos quais se atribui propriedades antifúngicas estão os fenólicos. Estes compostos também são denominados polifenóis e constituem uma classe de substâncias químicas que inclui diversas estruturas simples e complexas, derivados da fenilalanina e tirosina. A síntese dos mesmos pode ocorrer em quase todos os tecidos vegetais e há evidências que as estruturas fenólicas presentes naturalmente em diferentes porções dos vegetais possuem além de atividade antifúngica a possibilidade de controlar a produção de micotoxinas. Usualmente estes compostos localizam-se nas porções do vegetal mais expostas a contaminação microbiana, na região superficial e tecidos de proteção (NACZK ; SHAHIDI, 2004).

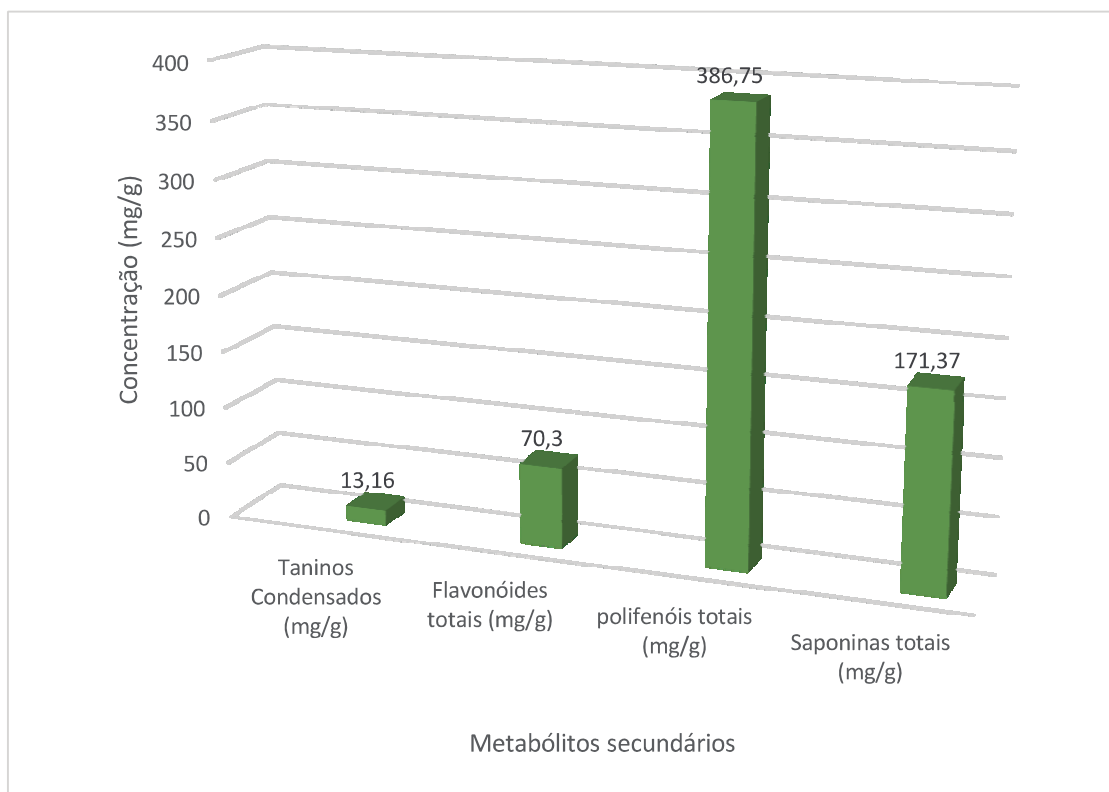
Estudos têm indicado um efeito inibitório dos compostos fenólicos no crescimento de fungos e produção de micotoxinas. Os ácidos fenólicos como o ferúlico, cinâmico e vanílico e seus derivados presentes em plantas são inibidores do crescimento fúngico e desenvolvimento dos esporos fúngicos. (SOUZA, 2008).

QUIROGA et al., (2001), verificaram a atividade antifúngica de metabólitos secundários extraídos de 10 espécies de plantas medicinais da Argentina e observaram, através de crescimento radial dos fungos, discos de difusão e crescimento em ágar contendo os extratos das plantas, que alguns extratos alcoólicos estudados inibiram o desenvolvimento de fungos e leveduras. A concentração mínima de extratos necessária contra leveduras variou de 100 a 400 µg/mL.

Fianco et al., (2013), afirmam que a atividade antimicrobiana observada no estudo deve-se em especial a presença de polifenóis totais em sua composição.

Em seguida foi observado um maior aumento da quantidade de saponinas totais, mostrada adiante na figura 7, que são glicosídeos de esteroides ou de terpenos policíclicos. É uma estrutura com caráter anfifílico, parte da estrutura com característica lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra hidrofílica (açúcares). Essa característica determina a propriedade de redução da tensão superficial da água e suas ações detergentes e emulsificante (SCHENKEL et al., 2001). São encontradas nos tecidos que são mais vulneráveis ao ataque fúngico, bacteriano ou predatório dos insetos (WINA et al., 2005), considerando-se parte do sistema de defesa das plantas e indicadas como “fitoprotetoras” (PIZARRO, 1999). Essa atividade seria devido a interação com os esteróis da membrana (FRANCIS et al., 2002).

Figura 7: Concentração de metabólitos secundários do extrato de *S. brasiliensis*.



No estudo de Bessa et al., (2013) foi atribuída a atividade antifúngica a presença de saponinas totais, e no estudo de Rebelo (2011), a presença da Diosgenina componente químico encontrado nas saponinas, segundo esse estudo também foi observado atividade antifúngica, tendo sido atribuída essa atividade a presença desse composto químico.

Foi observado a presença de flavonoides totais com 70,03 mg/g, os flavonoides são estruturas poli fenólicas de baixo peso molecular encontradas naturalmente nas plantas. Esses metabólitos secundários são de grande importância na manutenção da saúde de muitos animais herbívoros, incluindo o homem. Representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural (VALLIM et al., 2005).

Segundo Tallini, (2014), as antocianinas encontradas nos flavonoides possuem ação fungistática, e a quercetina atividade antifúngica.

Brum, (2006), atribui em seu estudo que a atividade antifúngica tem relação com a presença de flavonoides encontrada, mostrando com isso que a atividade antifúngica está relacionada com a presença de metabólitos secundários presentes nos extratos vegetais.

Nosso estudo encontrou uma menor quantidade de taninos condensados com 13,16 mg/g. Os taninos são compostos fenólicos presentes na maioria das plantas, que podem ter sua concentração variando de acordo com os tecidos vegetais, bem como em função da idade e tamanho da planta, da parte coletada, da época ou, ainda, do local de coleta (MONTEIRO et al., 2005).

Os taninos são comumente divididos em hidrolisáveis e condensados, em função da sua estrutura química. Os taninos hidrolisáveis são polímeros de ácido gálico (galotaninos) ou ácido hexahidroxidifênico (elargitaninos). Estão normalmente presentes em baixa concentração nas plantas e podem sofrer facilmente hidrólise por bases, ácidos e esterases. O metabolismo microbiano e a digestão gástrica convertem esses taninos em metabólitos de baixo peso molecular. (BEELEN et al., 2008).

Possuem importância marcante em alimentos, pois sua presença em baixas concentrações proporciona características sensoriais desejáveis, ditas como "o corpo da fruta". No entanto, concentrações elevadas conferem aos frutos e outros alimentos características adstringentes. A sensação de adstringência é gerada devido à propriedade que os taninos apresentam em precipitar proteínas, ou seja, quando em contato com as proteínas presentes na saliva formam um complexo insolúvel que popularmente se caracteriza pela sensação adstringente (DEGÁSPARI et al., 2005).

Segundo COSTA et al., (2009), a presença de taninos está diretamente relacionada com a atividade antifúngica encontrada em seu estudo.

Os flavonoides e taninos apresentam a habilidade de inativar enzimas e complexarem-se com proteínas extracelulares, proteínas solúveis e com a parede celular dos fungos, configurando os prováveis mecanismos de ação antifúngica. A total ruptura de membranas microbianas pode ser atribuída por flavonoides de caráter lipofílico (MENDES et al., 2011). Em decorrência desses achados pode-se dizer que a atividade antifúngica da *S. brasiliensis* está relacionada com a presença dos metabólitos secundários encontrados no extrato vegetal.

De acordo com o estudo de FERNANDES et al., (2015), o marcador químico da espécie de *S. brasiliensis* já foi identificado e quantificado sendo este o ácido gálico, a atual Lista dos compostos encontrado nas folhas de *S. brasiliensis* inclui a presença de taninos e polifenóis, tal Como galato de metila, ácido elágico hexa-flavonol (SARAIVA et al., 2011). Novo alquil fenóis metilo 6-eicosanoólio-2-hidroxi-4-metoxibenzoato e esteroide—epidioxy ergosta-6,22-dien-3. Estão ambos compostos isolados a partir da folha de *S. brasiliensis* (CARDOSO et al., 2005). O óleo essencial extraído a partir das folhas de *S. brasiliensis* tem uma boa quantidade de mirceno e baixa quantidade de outros compostos tal Como cariofileno, eucaliptol e guaio (DONATI et al., 2014).

O ácido gálico possui atividade antifúngica relatada na literatura e é considerado o composto majoritário presente nas folhas da *S. brasiliensis*. (FERNANDES et al., 2015; COCCARO, P., 2014; LEAL, P. C., 2004).

A utilização de produtos naturais mostra-se como uma alternativa no tratamento de infecções fúngicas, tornando interessante realizar outros ensaios para complementar este estudo, e talvez encontrar subsídios para o desenvolvimento de uma formulação e de ensaios clínicos futuros.

Os resultados desta pesquisa reforçam a informação de que o extrato de *Schinopsis brasiliensis* Engler apresenta atividade antifúngica, com a vantagem de ser um produto natural.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados, pode se concluir que:

- 1) A análise fitoquímica indica a presença de compostos fenólicos em sua maioria, seguido das saponinas totais. Sendo os metabólitos secundários presentes no extrato de *S. brasiliensis* responsável pela atividade antifúngica.
- 2) O extrato das folhas de *S. brasiliensis* possui forte ação antifúngica.
- 3) Em relação ao modo de ação, observou-se que, possivelmente, o extrato de *S. brasiliensis* atua na permeabilidade iônica da membrana celular fúngica. Podendo se tornar um excelente produto fitoterápico para o tratamento de infecções fúngicas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. AKPAN, A; MORGAN, R. Oral Candidiasis. **Postgraduate Medical Journal**, v. 78, p. 455- 459, 2002.
2. ALMEIDA, CFCBR; SILVA TCL; AMORIM ELC; MAIA MBS; ALBUQUERQUE UP. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the Caatinga (Northeast Brazil). **Journal of Arid**. 62 (1): 127–142. Jul 2005
3. ALBUQUERQUE, UP; MEDEIROS PM; ALMEIDA ALS; MONTEIRO JM; LINS NETO EMF; MELO JG; SANTOS JP. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**. 114 (1):325–354. Dec 2007
4. ALBUQUERQUE, UP. Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: a study in the Caatinga vegetation of NE Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**. 30 (2):1-10. Jul 2006
5. AMANLOU, M; BEITOLLAHI JM; ABDOLLAHZADEH S; TOHIDAST-EKRAZ Z. "Miconazole gel compared with Zataria multiflora Boiss. gel in the treatment of denture stomatitis," **Phytotherapy Research**, vol. 20, no. 11, pp. 966–969, 2006.
6. ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária), Resolução - RDC nº 150, de 17 de junho de 2003. p. 76-76, 156p. 2003. Disponível em: <pt.scribd.com/doc/58116383/Fasciculo-4-da-Parte-II-da-4%C2%AA-Edicao-da-Farmacopeia-Brasileira>. Acesso em: 04 fev. 2012
7. BESSA, NGL. DEL; BORGES, JCM; BESERRA, FP; CARVALHO, RHA; PEREIRA, MAB; FAGUNDES, R; CAMPOS, SL; RIBEIRO, LU; QUIRINO, MS; CHAGAS JUNIOR, A. F; ALVES, A. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. **Rev. bras. plantas med.** vol.15 no.4 supl.1 Botucatu 2013
8. BEELEN PMG; FILHO JMP; BEELEN RN. Avaliação de taninos condensados em plantas forrageiras. **Associação brasileira de zootecnistas**. João Pessoa, Paraíba, 2008.

9. BRASIL. Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 de março de 2004.
10. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto n. 5813 de 22 de Abril de 2006: Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2006.
11. BRASILEIRO MT. *Ximenia Americana* L. Botânica, química e farmacologia no interesse da tecnologia farmacêutica. **Revista brasileira de farmácia**. 89 (2):164-167, 2008.
12. BRUM LP. **Atividade antiviral dos compostos fenólicos (ácidos ferúlico e transcinâmico) e dos flavonoides (quercetina e kaempferol) sobre os herpesvírus bovino 1, herpesvírus bovino 5 e vírus da cinomose canina**. Tese. Viçosa, Minas Gerais. 2006.
13. BRUNING, MCR; MOSEGUI, GBG; VIANA, CMM. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência e Saúde coletiva**, v. 17, n. 10, p. 2.675-2.685, 2012.
14. BRUL, S; KLIS, FM. 1999. Mechanistic and Mathematical Inactivation studies of food spoilage fungi. **Fungal Genetics and Biology**, 27: 199-208
15. CARDOSO, MP; DAVID JM; JUCENI PD. A new alkyl phenol from *Schinopsis brasiliensis*", **Nat. Prod. Research.**, 19(5): 431-433, 2005.
16. CARDOSO, MP; DAVID, JM; DAVID, JP. A new alkylphenol from *Schinopsis brasiliensis* Engl. **Nat. Prod. Res.** 19, 431–433. 2005.
17. CARVALHO, PER. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**; Colombo: Embrapa Florestas. v. 3. 2008
18. CARVALHO, PER. Braúna-do-sertão – *Schinopsis brasiliensis*. **Embrapa - Comunicado Técnico 222**. p.1-9, 2009. Disponível em: <<http://www.cnpf.embrapa.br/>> acesso em: 15 out. 2011.
19. CARTAXO-FURTADO, NADEO; SAMPAIO, TO; XAVIER, MA; MEDEIROS, ADDE; PEREIRA, JV. Perfil fitoquímico e determinação da atividade antimicrobiana de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae)

- frente a microrganismos bucais. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.4, supl. III, p.1091-1096, 2015.
20. CLSI. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Norma M27-A2. Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica. 2.ed. Pennsylvania: **NCCLS**; 2002. 51p.
21. CLSI. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Norma M27-A2. Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica. Pennsylvania: **NCCLS**; 2005.
22. CHAMBÔ, FA; SOUZA FJB; PIGNATON CC; ZON I; FERNANDES AS; CARDOSO LQ. Chronic mucocutaneous candidiasis: a case with exuberant cutaneous horns in nipples. **An Bras Dermatol.** 89 (4): 641-4, 2014.
23. CHANDRA S, MEJIA EG. Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Quinone Reductase Activity of an Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in Comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. **J. Agric. Food Chem.** 52(11):3583-9. 2004.
24. CHAVES, TP; DANTAS IC; FELISMINO DC; VIEIRA CVM; CLEMENTINO ELC; COSTA LS. Atividade antimicrobiana das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engler. **Revista de Biologia e Farmácia.** 5(2):11-17.2015
25. CRAGG, GM; GROTHAUS PG, NEWMAN DJ. Impact of natural products on developing new anticancer agents. **Chem Rev.**109:3012–43. 2009.
26. COCCARO P. **AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIFÚNGICA IN VITRO, FITOQUÍMICA E ECOTOXICOLÓGICA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA OBTIDA A PARTIR DAS FOLHAS DE TERMINALIA CATAPPA L. (COMBRETACEAE).** Dissertação, Santos, São Paulo, 2014.
27. COELHO AMSP; SILVA GA; VIEIRA OMC; CHAVASCO JK. Atividade antimicrobiana de *Bixa orellana* L (Urucum). **Revista Iecta**, Bragança paulista, v.21, n. 1-2, p. 47-54, 2003.
28. CORONALDO-CASTELLOTE, JIMENEZ-SORIANO, Y. “Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis,” **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, vol. 5, no. 5, pp. 279–286, 2013.

29. COSTA, ACBP. da; PEREIRA CA; FREIRE F; JUNQUEIRA JC; JORGE AOC. Atividade antifúngica dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn e *Syzygium cumini* Linn. sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 38, n. 2, 111-116, 2009.
30. COUTINHO, HDM; COSTA JGM; SIQUEIRA-JUNIOR JP; LIMA EOM. Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.** 33, 467–471.
31. DANTAS, BF; SOARES FSJ; LÚCIO AA; ARAGÃO CA. Alterações bioquímicas durante a embebição de sementes de baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.). **Revista Brasileira de Sementes.** 30 (2):214-219. Jan 2008.
32. DEGÁSPARI CH; WASZCZYNSKYJ N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão acadêmica.** Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, jun, 2004.
33. DESWAL DP, CHAND U. Standardization of the tetrazolium test for viability estimation in rice bean (*Vigna umbellata* T.) seeds. **Seed Science and Technology.** 1997; 25: 409-417.
34. DIMOPOULOS G; ANTONOPOULO A, ARMAGANIDIS A, VICENT L. How to select an antifungal agent in critically ill patients. **J Crit Care.** 28:717–27. 2013
35. DJOUOSSI, MG; JEAN-DE-DIEU T; DAVID N; JULES-ROGER K; LEON AT; DOMINIQUE HA; LAURENCE VN. BMC Complementary and Alternative Medicine et al. Antimicrobial and antioxidant flavonoids from the leaves of *Oncoba spinosa* Forssk. (Salicaceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine.** 15:134. 2015.
36. DONATI, M; MONDIN, A; CHEN, Z; MIRANDA, FM; NASCIMENTO JÚNIOR, BB; SCHIRATO, G; PASTORI, P; FROLDI, G, 2014. Radical scavenging and antimicrobial activities of *Croton zehntneri*, *Pterodon emarginatus* and *Schinopsis brasiliensis* essential oils and their major constituents: estragole, trans-anethole, -caryophyllene and myrcene. **Nat. Prod. Res.** 29, 939–946.
37. DUARTE, MCT; LEME, EE; DELARMELENA, C; SOARES, AA; FIGUEIRA, GM; SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 197-201, 2007.

38. ESCALANTE A, GATTUSO M, PÉREZ P, ZACCHINO S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. **J Nat Prod.** 2008;71:1720–5.
39. FERREIRA, GLS. Does Scientific Evidence for the Use of Natural Products in the Treatment of Oral Candidiasis Exist? A Systematic Review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.** P. 8, 2015
40. FERNANDES FHA; BATISTA RSA; MEDEIROS FD; SANTOS FS; MEDEIROS ACD. Development of a rapid and simple HPLC-UV method for determination of gallic acid in *Schinopsis brasiliensis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** 25 (2015) 208–211
41. FIANCO, ALB; FALCÃO, MA; CASSEL, E; MILÃO, D. Determinação da atividade antimicrobiana e teor de polifenóis totais de extratos etanólicos de própolis das abelhas sem ferrão *Tetragonisca angustula* (jataí) e *Scaptotrigona bipunctata* (tubuna). **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v.14, n.21, p.01-112, jan./jun. 2013.
42. FRANCIS G. The biological action of saponins in animal systems: a review. **The British journal of nutrition.** V. 88, n. 6, p. 587-605, dez 2002.
43. FUMAGALI, E. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** Vol. 18, n. 4. João Pessoa, 2008.
44. GARCIA-CUESTA C; SARRION-PÉREZ MG; BAGÁN JV. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. **J Clin Exp Dent.** 6 (5): 576-82. 2014
45. GONZAGA, TWC; MATA MERM, C; SILVA H; DUARTE MEM. Crioconservação de sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* Engl.), e baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais.** 5(2):145-154. Out 2003
46. HAMILL, RJ. Amphotericin B, formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. **Drugs.** 73:919–34. 2013
47. KLEIN T; LONGHINI R; BRUSCH ML; MELLO JCP. Fitoterápicos: um Mercado promissor. **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada.** V. 30, n. 3, p. 241-248, 2009.

48. LEAL PC. **Síntese e avaliação da atividade antifúngica de compostos derivados do ácido gálico.** Dissertação, Florianópolis, Santa Catarina. 2004.
49. LIMA IO; PEREIRA FO; OLIVEIRA WA; LIMA EO; MENEZES EA; CUNHA FA. Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. **J Essential Oil Res** 25: 138-142. 2013.
50. LOPES G; PINTO E; ANDRADE PB; VALENTA P. Antifungal Activity of Phlorotannins against Dermatophytes and Yeasts: Approaches to the Mechanism of Action and Influence on *Candida albicans* Virulence Factor. **PloS ONE** 8: e72203. 2013.
51. MARTÍNEZ-BENEYETO, Y; LÓPEZ-JORNET P, VELANDRINO-NICOLÁS A, JORNET-GARCÍA V. Use of antifungal agents for oral candidiasis: results of a national survey. **Int J Dent Hyg.** 2010;8:47-52.
52. MARINO, M; BERSANI, C; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. **International Journal of Food Microbiology**, n. 67, p. 187-195, 2001.
53. MAKKAR HPS; BECKER K. Vanillin-HCl method for condensed tannins: Effect of organic solvents used for extraction of tannins. **J. Chem. Ecol.** 19(4):613-21. 1993.
54. MAKKAR HBS; SIDDHURAJU P; BECKER K. Plant Secondary Metabolites. Berlin: **Humana Press.** 2007.
55. MEDA A, LAMIEN CE, ROMITO M, MILLOGO J, NACOULMA OG. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chem.** 91(3):571-7. 2005.
56. MEDEIROS, KCP; MONTEIRO JC; DINIZ MFFM; MEDEIROS IA; SILVA BA; PIUVEZAM MR. Effect of the activity of the Brazilian polyherbal formulation: *Eucalyptus globulus* Labill, *Peltodon radicans* Pohl and *Schinus terebinthifolius* Radd in inflammatory models. **Rev. Bras. Farmacogn.** 17:23-8. 2007
57. MENDES LPM; MACIEL KM; VIEIRA ABR; MENDONÇA LCV; SILVA RMF ROLIM-NETO PJ, BARBOSA WLR, VIEIRA JMS. Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Rev Ciên Farm Básica Apl.** 2011; 32(1):121-5.

58. MONTEIRO, JM; ALBUQUERQUE, UP; ARAÚJO, EL; AMORIM, ELC. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.
59. NACZK, M; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food (Review). **Journal of Chromatography A**, n. 1054, p. 95-111, 2004.
60. PATIL S; RAO RS; MAJUMDAR B; ANIL S. Clinical Appearance of Oral Candida Infection and Therapeutic Strategies. **Frontiers in Microbiology**. v. 6. December 2015.
61. PEREIRA RD; VELOSO JAP; MOTA HF; MOTA BCF; FREITAS RF; ROYO VA. Estudo in vitro da atividade antifúngica do extrato de guaco (*Mikania glomerata*) contra *Candida albicans*. **Conexão ci.: r. cient.** UNIFOR-MG, Formiga, v. 9, n. 1, p. 31-38, jan./jun. 2014.
62. PERLIN DS. Current perspectives on echinocandin class drugs. **Future Microbiol.** 2011, 6(4): 441-457.
63. PEIXOTO LR. **Análise química, atividade antifúngica, modo de ação e efeito anti-biofilme do óleo essencial de *Laurus nobilis* Linnaeus.** Dissertação, João Pessoa, Paraíba, 2015.
64. PIERCE CG, SRINIVASAN A, UPPULURI P, RAMASUBRAMANIAN AK, LÓPEZ-RIBOT JL. Antifungal therapy with an emphasis on biofilms. **Curr Opin Pharmacol** 13: 726-730. 2013.
65. PIZARRO, APB; FILHO, AMO; PARENTE, JP; MELO, MTV; SANTOS, CE; LIMA, PR. O aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas de mosquitos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.32, n.1, p. 23-29, 1999.
66. QUIROGA, EN; SAMPIETRO, AR; VATTUONE, MA. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 74, p. 89-96, 2001.

67. RASOOLI I, ABYANEH MR. Inhibitory effects of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Food Control**. 15: 479-83. 2004.
68. REBELO AIMA. **Diosgenina e derivados oxidados: potenciais agentes antitumorais e antifúngicos**. Dissertação. Covilhã, 2011.
69. ROCHA WS; LOPES RM; SILVA DB; VIEIRA RF; SILVA JP; AGOSTINI-COSTA TS. Compostos fenólicos e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 33, n. 4, p. 1215-1221, Dezembro 2011.
70. SANTOS MGC; PEREIRA JV; NÓBREGA DRM. Potencial antifúngico da *Punica granatum* Linn na odontologia. **Rev. Bras. Pesq. Saúde**, Vitória, 16(1): 112-117, jan-mar, 2014.
71. SARAIVA, AM; CASTRO RHA; RISONILDO PC; SOBRINHO PEIXOTO TJS; CASTRO VTNA; AMORIM ELC; XAVIER HS; PISCIOTTANO MNC. In vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial and toxicity properties of extracts of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 5 (14):1724-1731. Out 2011.
72. SARAIVA, AM; SARAIVA CL; CORDEIRO RP; SOARES RR; XAVIER HS; CAETANO N. Atividade antimicrobiana e sinérgica das frações das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a clones multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 15(2):199-207. Abr 2013.
73. SARAIVA AM; CASTRO RHA; CORDEIRO RP; PEIXOTO SOBRINHO TJS, CASTRO VTNA, AMORIM ELC, XAVIER HS, PISCIOTTANO MNC. In vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial and toxicity properties of extracts of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae). **Afr. J. Pharm. Pharmacol**. 5(14):1724-31, 2011.
74. SCHENKEL, EP; GOSMANN, G; ATHAYDE, ML. Saponinas. In: SIMÕES, CM; SCHENKEL, EP; GOSMANN, G; MELLO, JCP.; MENTZ, LA; PETROVICK, PR. **Farmacognosia: da planta ao medicamento** .3 ed. Porto Alegre: Ed. UFGRS/Ed. UFSC, cap.27, p.597-619. 2001.
75. SEDICIAS, S. **Candidíse oral**. Disponível em: < <http://www.tuasaude.com/candidiase-oral/>> Acesso em: 08 maio. 2015.

76. SIDDIQI ZN, FAROOQ F, MUSTHAFA TNM, AHMAD A, KHAN AU. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. **J Saudi Chem Soc** 17: 237-243, 2013.
77. SHAH, PM. The need for new therapeutic agents: What is in pipeline? **Clin Microbiol Infect.** 11: 36–42. 2005.
78. SHIP, JA; VISSINK A; CHALLACOMBE SJ. Use of prophylactic antifungals in the immunocompromised host. **Oral Sugery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 103, Supplement 1, p. S6. E1 – S6.e14, 2007.
79. SILVA-ROCHA WP; LEMOS VLB; FERREIRA MRA; SOARES LAL; SVIDZISNKI TIE; MILAN EP; CHAVES GM. Effect of the crude extract of *Eugenia uniflora* in morphogenesis and secretion of hydrolytic enzymes in *Candida albicans* from the oral cavity of kidney transplant recipients. **BMC Complementary and Alternative Medicine.** 15:6. 2015.
80. SILVA, MSP; BRANDÃO, DO; CHAVES, TP; FORMIGA FILHO, ALN; COSTA, EMMB; SANTOS, VL; MEDEIROS, ACD. Study bioprospecting of medicinal plant extracts of the semiarid northeast: contribution to the control of oral microorganisms. **Evid.-Based Complement. Altern. Med.**, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/681207>. 2012.
81. SILVA MRO. **DETECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DE PLANTAS DO MANGUEZAL DE VILA VELHA, ITAMARACÁ-PE.** Dissertação, Recife, Pernambuco. 2004.
82. SILVERMAN, S; EVERSOLE, R; TRUELOVE, EL. **Fundamentos de Medicina Oral.** 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 210 p. 2004.
83. SOUZA MM. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIMICOTOXINAS DE EXTRATOS DE FARELO DE ARROZ, CEBOLA E MICROALGA CHLORELLA.** Dissertação, Rio Grande, Rio Grande do Sul. 2008.
84. SUN N, FONZI W, CHEN H, SHE X, ZHANG L, ZHANG L, CALDERONE R. Azole Susceptibility and Transcriptome Profiling in *Candida albicans* Mitochondrial Electron Transport Chain Complex I Mutants. **Antimicrob Agents Chemother** 57: 532-542. 2013.

85. TALLINI LR. **Validação de metodologias analíticas para quantificação de quercetina e canferol em extratos hidrolisados de folhas de *Rubus erythrocladus*, *Rubus idaeus* e *Morus nigra* e screening antifúngico desses extrato.** Dissertação, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 2014.
86. TALLURY, P; RANDALL MK; KALACHANDRA S. Effects of solubilizing surfactants and loading of antiviral, antimicrobial and antifungicuppal on their release rafes from ethylene vinyl acetate copolymer. **Dental Material**, v. 23, p. 977-982, 2007.
87. TSANG, PW; BANDARA HMHN; FONG WP. Purpurin suppresses *Candida albicans* biofilm formation and hyphal development. **PLoS One**. 7: e50866, 2012.
88. WILLE, MP; GUIMARÃES T; FURTADO GH; COLOMBO AL. Historical trends in the epidemiology of candidaemia: analysis of an 11-year period in a tertiary care hospital in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 3:108. 2013.
89. WILLIAMS, D; LEWIS, M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. **J Oral Microbiol**. 28:3. 2011.
90. WINA, E.; MUETZEL, S.; BECKER, K. The Impact of Saponins or Saponin-Containing Plant Materials on Ruminant Production - **A Review**. **Journal of Agricultural and Food Chemistry [online]**, v.53, n.21, p.8093–8105, 2005.
91. WHO (World Health Organization). **The Global Burden of Disease-2004 UPDATE**. WHO Press, 146p. 2008.
92. VALLIM, MA; DE PAULA, JC; PEREIRA, RC. The diterpenes from Dictyotacean marine brown algae in the Tropical Atlantic American region. **Biochem. Syst. Ecol**. v. 33, p. 1-33, 2005.
93. VASCONCELOS, LCS; SAMPAIO MC; SAMPAIO FC; HIGINO JS. "Use of *Punica granatuma* as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis," **Mycoses**, vol. 46, no. 5-6, pp. 192–196, 2003.

94. VERAS, HNH; RODRIGUES FF; COLARES AV; MENEZES IR; COUTINHO HD; BOTELHO MA; COSTA JG. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol. **Fitoterapia** 83, 508–512. 2012.