



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

MYLLENA ALVES XAVIER

**ESTUDOS COM EXTRATO DE *Syzygium cumini* (L.) Skeel: PERFIL FITOQUÍMICO E
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA SOBRE *Candida albicans***

**CAMPINA GRANDE- PB
2015**

MYLLENA ALVES XAVIER

ESTUDOS COM EXTRATO DE *Syzygium cumini* (L.) Skeel: PERFIL FITOQUÍMICO E
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA SOBRE *Candida albicans*

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Graduação em Odontologia da
Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento
à exigência para obtenção do título de bacharel em
odontologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Jozinete Vieira Pereira

CAMPINA GRANDE- PB
2015

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.

X3e Xavier, Myllena Alves.

Estudos com extrato de *Syzygium cumini* (L.) Skeel
[manuscrito] : Perfil fitoquímico e atividade antimicrobiana sobre
Candida Albicans / Myllena Alves Xavier. - 2015.

35 p.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia)
- Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas
e da Saúde, 2015.

"Orientação: Profa. Dra. Jozinete Vieira Pereira,
Departamento de Odontologia".

1. Fitoterapia. 2. *Candida albicans*. 3. Atividade antifúngica.
I. Título.

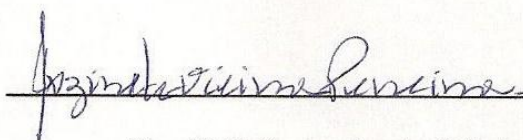
21. ed. CDD 615.321

MYLLENA ALVES XAVIER

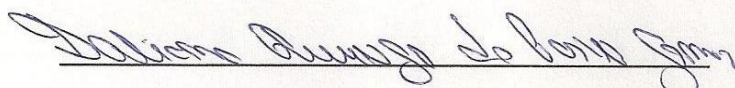
ESTUDOS COM EXTRATO DE *Syzygium cumini* (L.) Skeel: PERFIL FITOQUÍMICO E
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA SOBRE *Candida albicans*

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Graduação em Odontologia da
Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento
à exigência para obtenção do título de bacharel em
odontologia.

Aprovado em 18/06/2015

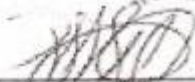


Profª Drª. Jozinete Vieira Pereira
Orientadora



Profª Drª Daliana Queiroga de Castro Gomes

(1º Examinador)



Prof Msc Pedro Henrique Sette de Souza

(2º Examinador)

Dedico a Deus, o autor da minha fé, que esteve em cada passo dessa caminhada. A Ele, ofereço essa conquista: porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar e acima de todos, agradeço a Deus, por me guiar e me guardar durante essa caminhada, por fazer de mim, uma pessoa realizada na profissão que escolhi para exercer por toda a minha vida.

À minha família. Minha mãe Luciana por toda motivação e amor, o meu pai Sidenei pelas renúncias e cuidado, ao meu irmão Mykael por acreditar nesse meu sonho como se fosse dele, por escutar todas as histórias da minha graduação e vibrar com cada conquista. Aos meus avós, tios e primos que não mediram esforços para me ajudar durante esses anos. Por tanto afeto eu só posso dizer que amo vocês da mais bela forma que possa existir no reino dos sentimentos.

Aos meus colegas de classe por todos os resumos compartilhados, todo o apoio oferecido e pelas melhores risadas que tornaram esses cinco anos inesquecíveis. Além deles, aos meus amigos fora dos limites acadêmicos, esses, que de alguma forma contribuíram também nessa etapa da minha vida. Em especial, gostaria de prestar minha homenagem a minha amiga, dupla, irmã: Michele - obrigada por essa parceria de onze anos, você é meu anjo, sou grata a Deus por tudo que construímos de afetividade e amizade.

À professora orientadora Jozinete Vieira Pereira, por todos os ensinamentos e oportunidades que me ofereceu, pela dedicação e paciência, por acreditar na minha capacidade e direcionar meus passos acadêmicos.

Agradeço aos meus queridos mestres por todo conhecimento e motivação, que muitas vezes foram além da odontologia, direcionamentos a competência e ao crescimento pessoal e profissional.

Agradeço a minha colega farmacêutica Nathália Cartaxo, por tudo que me ensinou, colaborando totalmente para o êxito dessa pesquisa.

Obrigada a todos os funcionários do departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, pelo apoio, respeito e atenção. Juntamente com estes, meu agradecimento aos pacientes, pela colaboração e confiança, obrigada por serem o motivo da minha dedicação contínua à odontologia.

A todos, o meu sincero agradecimento!

LISTA DE TABELAS

- Tabela1** - Composição química do extrato liofilizado de folhas de *S. cumini* L. Skeel obtidos por espectroscopia na região do visível.....26
- Tabela 2**- Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos extratos liofilizados de folhas de *S. cumini* de três análises (I, II e III) em dias alternados.....28

LISTA DE SIGLAS

AlCl_3 – Cloreto de Alumínio

ATCC – American Type Culture Collection

CFM- Concentração Fungicida Mínima

CIM- Concentração Inibitória Mínima

CLSI – Clinical and Laboratorial Standards Institute

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

S. Cumini- Syzygium Cumini

UEPB- Universidade Estadual da Paraíba

Mg – Miligramas

ml- mililitro

pH – Potencial de Hidrogênio

μg - Micogramas

μL - Microlitros

RESUMO

Os extratos vegetais podem ser uma alternativa a ser incorporado às novas formulações Os extratos vegetais podem ser uma alternativa a ser incorporada às novas formulações farmacêuticas, devido à presença de metabólitos secundários, por apresentarem propriedades que podem ser direcionadas à atividade antimicrobiana. O objetivo desse estudo foi analisar o perfil fitoquímico e a atividade antifúngica do extrato bruto de folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeel sobre a *Candida albicans*. A análise fitoquímica foi realizada por espectroscopia na região do visível e quantificou-se polifenóis, flavonoides, taninos condensados e saponinas totais. A atividade antifúngica foi realizada por meio da técnica de microdiluição em caldo. Determinou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do extrato liofilizado de folhas frente à *Candida albicans* (ATCC 10231). A quantificação de metabólitos secundários obteve resultados relevantes, especialmente com altas concentrações de saponinas e polifenóis totais. O extrato apresentou grande potencial antifúngico, demonstrando forte atividade fungistática e fungicida. O *S. cumini* é uma planta com bom potencial antifúngico e aceitáveis concentrações de compostos fitoquímicos, sendo por isso recomendado a continuação do seu estudo, objetivando no futuro, o desenvolvimento de um fitoterápico adjuvante ao tratamento de candidoses bucais resistentes à terapia convencional.

PALAVRAS-CHAVES: Fitoterapia. *Syzygium cumini*. *Candida albicans*

ABSTRACT

The plant extracts may be an alternative incorporation of new pharmaceutical formulations due to the presence of secondary metabolites that show antimicrobial activity properties. The aim of this study was to analyze the phytochemical profile and the antifungal activity of the crude extract of leaves of *Syzygiumcumini* (L.) Skeel on *Candida albicans*. The phytochemical analysis was performed by spectroscopy in the visible region to quantify polyphenols, flavonoids, condensed tannins and total saponins. The antifungal activity was carried out by microdilution technique in broth. It was determined the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Fungicidal Concentration (MFC) of the lyophilized extract of leaves to compare to the *Candida albicans* (ATCC 10231). The quantification of secondary metabolites got satisfactory results, especially with high concentrations of total polyphenols and saponins. The extract showed great potential antifungal with strong fungistatic and fungicidal activity. In conclusion, *S. cumini* is a plant with good potential antifungal and acceptable concentrations of phytochemicals compounds. Therefore, the continuation of its study is highly recommended. In addition, to get in the future, it is important to develop a phytotherapeutic to be an adjuvant to oral candidiasis treatment, which is resistant to conventional therapy.

KEYWORDS: Phytotherapy; *Syzygium cumini*; *Candida albicans*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 CANDIDOSE BUCAL	12
2.2 COLONIZAÇÃO DA <i>Candida albicans</i> NA CAVIDADE BUCAL	13
2.3 <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeel	15
2.4 FITOCONSTITUINTES DO <i>Syzygium cumini</i>	16
3 OBJETIVOS	19
3.1 GERAL	19
3.2 ESPECÍFICOS	19
4 METODOLOGIA	20
4.1 MATERIAL VEGETAL	20
4.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS, FLAVONOÍDES, SAPONINAS TOTAIS E TANINOS CONDENSADOS	20
4.3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	22
4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) PELO MÉTODO DA MICRODILUIÇÃO	23
4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS, FLAVONOÍDES, SAPONINAS TOTAIS E TANINOS CONDENSADOS.	25
5.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)	27
6 CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

A candidose constitui um espectro de infecções causadas por fungos do gênero *Candida* e, ao longo das três últimas décadas, tem ocorrido um aumento na sua prevalência, devido ao crescente número de pacientes que apresentam comprometimento do sistema imunológico, incluindo os indivíduos com infecção pelo HIV, transplantados, pacientes que recebem terapia antineoplásica (radioterapia e/ ou quimioterapia), aumento da incidência de diabéticos, assim como o uso prolongado de antibióticos de largo espectro. Todos esses fatores contribuem para o desenvolvimento da candidose bucal (DONGARI- BAGTZOGLOU; FIDEL JÚNIOR, 2005; MENEZES et al., 2007; BASTOS et al., 2010; FARAH; LYNCH; McCULLOUGH, 2010).

Muitos medicamentos sintéticos foram desenvolvidos para o tratamento da candidose bucal ao longo dos anos, contudo é fundamental que a busca por novas terapias continuem, já que essa infecção pode variar desde o leve envolvimento das superfícies mucosas a doença fatal em pacientes gravemente imunodeprimidos (NEVILLE et al., 2009). Uma diversidade de antifúngicos existentes no mercado está relacionada a alguns fatores indesejáveis como resistência de algumas cepas a esses fármacos ou presença de efeitos adversos indesejados, principalmente em pacientes que apresentam alterações do sistema imunológico (PINTO, 2003; MENEZES et al., 2009).

O uso de plantas medicinais, no Brasil, vem se ampliando nos últimos anos, e o estudo dessas plantas que apresentam propriedades terapêuticas, abrangendo as antifúngicas, tem crescido consideravelmente (MENEZES et al., 2009). Muitas plantas medicinais de uso já comprovado pela farmacologia e medicina já são encontradas e podem ser indicadas para uso na prática odontológica (PEREIRA et al., 2009).

Syzygium cumini L. também nomeado por *Eugenia jambolana*, *Eugenia cumini* e *Syzygium jambolana*, pertencente a família Myrtaceae. Possui frutos são vulgarmente conhecidos como jamun (Hindi), ameixa indiana, jambolão, jambul. É uma árvore grande, da floresta perene amplamente distribuído da Índia, Sri Lanka, Malásia e Austrália, sendo também é cultivada por seus frutos comestíveis. Foi introduzida da Índia e da Ásia tropical para o sul da África se estendendo com êxito para muitos países tropicais (CHASE; REVEAL, 2009).

Vários estudos demonstram a atividade antimicrobiana de *S. cumini* frente a um número considerável de microrganismos, dentre esses *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Proteus spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella spp.*, *Proteus spp.*, *Enterobacter aerogenes* e *Escherichia coli* (NASCIMENTO et al., 2000; HOFLING et al., 2010). Além disso *S. Cumini* tem se destacado por apresentar outras propriedades farmacológicas importantes como atividade antioxidante e antiproliferativa sobre células tumorais (AFIFY et al. 2011).

As plantas podem ser uma alternativa aos antifúngicos sintéticos que apresentam muitas reações adversas, são mais onerosos e frequentemente os microrganismos têm desenvolvido mecanismos de resistência frente a esses fármacos (PANCHAVARNAKILI et al., 2012). A importância desse estudo é ratificada no fato de que os agentes fitoterápicos produzem menos agressões ao organismo, apresentando-se como terapia alternativa frente aos microrganismos resistentes ao tratamento com medicamentos alopáticos.

Diante do exposto, este estudo tem como objetivo, analisar o perfil fitoquímico e a atividade antifúngica do extrato de folhas do *Syzygium cumini* (L.) Skeel sobre *Candida albicans*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CANDIDOSE BUCAL

A candidose bucal é uma infecção oportunista tendo por agente etiológico leveduras do gênero *Candida*, sendo a *Candida albicans* a maior responsável por desencadear as afecções bucais. Normalmente, acomete pacientes idosos, indivíduos comprometidos imunologicamente e crianças. Clinicamente pode apresentar-se como: placas pseudomembranosas, eritematosas, áreas hiperplásicas, queilite angular e muitas vezes associada a glossite romboide mediana. A sensação de dor e/ou queimação é relatada pelos pacientes (SAMSON, 2013).

Segundo Xu et al. (2013) a candidose bucal está entre as três doenças infecciosas que mais acometem pacientes com neoplasias maligna, submetidos a métodos de terapia antineoplásica. O risco aumentado para a candidose é explicado devido a altas doses de radiação em extensos campos que incluem a cavidade bucal provocando uma redução no do fluxo salivar. Além disso, a atividade fagocítica reduzida dos granulócitos salivares frente a microrganismos pode explicar a maior predisposição dos pacientes irradiados à candidose (JHAM; FREIRE, 2006).

Três antimicóticos sistêmicos têm sido amplamente utilizados no tratamento da infecção por *Candida*, o fluconazol, itraconazol e cetoconazol. Porém, a hepatotoxicidade resultou na contra indicação do cetoconazol. Os azóis orais podem apresentar também, desconforto gastrointestinal e efeitos colaterais sistêmicos. A nistatina tópica é a droga de escolha para o tratamento das infecções por *Candida* da cavidade oral. A nistatina e o miconazol os antifúngico tópicos de escolha no tratamento da candidose. A principal queixa associada à nistatina é seu gosto amargo, repugnante. (SOBEL, 2014).

Bonifait et al. (2012) analisaram composto ativos obtidos a partir de plantas que pertencem à família Rutaceae, descobriram moléculas naturais com forte potencial para a prevenção e tratamento de infecções bucais comuns, incluindo a candidose pelo fato de inibir o crescimento da *Candida albicans*. Essa atividade pode ser explicada, pois os fitoconstituintes apresentam uma propriedade quelante de ferro, que por sua vez interfere no crescimento microbiano.

Um estudo etnobotânico com curandeiros da Tanzânia teve por objetivo identificar de 36 espécies vegetais pertencentes a 21 famílias de plantas que são utilizadas tradicionalmente para o tratamento de infecções por *Candida*. O conhecimento dos curandeiros tradicionais sobre o tratamento de infecções por *Candida* foi extremamente acatado pela literatura, treze (36,1%) das espécies tiveram a atividade antifúngica previamente avaliada, validando a eficácia dos extratos de plantas medicinais no tratamento de infecções por *Candida*. A raiz foi a parte mais utilizada da planta seguido por folha, caule e ervas inteiras. A via de administração depende do tipo de infecção *Candida*, no entanto, a via de maior escolha foi a oral (RUNYORO et al., 2006).

É importante a busca de alternativas terapêuticas eficazes frente à Candidose bucal, visto que é uma infecção odontológica que atinge indivíduos saudáveis e imunocomprometidos. O sistema imune é o principal fator que define a transição do fungo de comensal para patogênico, porém os fatores de patogenicidade expressados por *C. albicans*, tais como adesinas, mudança fenotípica, variedade genotípica, comportamento dimórfico, e secreção de exoenzimas, podem contribuir para a persistência da colonização, assim como o desenvolvimento de sintomatologia decorrente da infecção fúngica (ROSSI et al., 2011).

2.2. COLONIZAÇÃO DA *Candida albicans* NA CAVIDADE BUCAL

O mecanismo de aderência é fundamental para colonização sobre o tecido e estabelecimento da infecção fúngica. O primeiro estágio de patogênese ocorre com a adesão da *C. albicans* ao substrato, seu biofilme apresenta arquitetura complexa, onde há predomínio de células filamentosas, leveduriformes e intercaladas (RODRIGUES et al., 2007).

As adesinas são manoproteínas presentes na parede das leveduras do gênero *Candida*, que possibilitam sua aderência a receptores extracelulares, como fibronectina, fibrinogênio, e laminina encontrados nos tecidos humanos. O Agglutinin-Like Sequence (Als) é um gene presente na *C. albicans*, responsável por codificar glicoproteínas de superfície celular relacionadas ao processo de adesão às superfícies das membranas

mucosas, esse processo acontece quando o fungo encontra uma proteína ligada ao tecido (KLOTZ; LIPKE, 2010; WINGETER et al., 2007).

Por possuir uma grande variação fenotípica e genotípica a *Candida albicans* apresenta diferentes biótipos. As mudanças fenotípicas atuam no processo infeccioso, pois torna o fungo mais patogênico durante o processo de invasão ao hospedeiro. Geneticamente foi comprovada a existência do locus tipo, Martyng Tipe (MTL), responsável por induzir alterações recombinantes entre as cepas, mutações no padrão do MTL desencadeiam mudanças fenotípicas (GONZALEZ et al., 2008).

A *Candida* apresenta um comportamento dimórfico, uma vez que possui a capacidade de se diferenciar da forma unicelular leveduriforme para a forma filamentosa (hifas ou pseudo-hifas), esse fenômeno permite que o fungo se adapte às condições biológicas diversificadas. A morfologia celular deste fungo comporta-se nas formas de leveduras e de hifas tanto durante o crescimento comensal, como também durante o processo de infecção. As células fúngicas invadem a mucosa através da formação de hifas, que também desempenham um papel importante, evitando que a *C. albicans* seja englobada por macrófagos e neutrófilos. A transição de levedura para hifa é influenciada pelas condições do meio, tal quais o pH, fontes de substâncias químicas, temperatura (KULETA; KOZIK, 2009).

As exoenzimas secretadas pelas leveduras assumem um importante fator de virulência. Quanto maior o nível de fosfolipase na *Candida* maior será a sua patogenicidade, isso é explicado pelo fato dessas enzimas degradarem fosfolípidos, o que leva a uma danificação dos constituintes lipídicos da membrana celular, ocasionando a lesão tecidual no hospedeiro. O mecanismo de ação da fosfolipase consiste na liberação de produtos tóxicos, a exemplo da lisolecitina que atua na destruição de eritrócitos (NIEWERTH; KORTING, 2001).

As cepas com maior aderência ao epitélio bucal são as que apresentam uma elevada atividade proteolítica, a enzima responsável por esse mecanismo é a proteinase, sua atividade é devido a classe de proteinase, aspartil-proteases (Sap). Sendo esta responsável por degradar proteínas, como colágeno, queratina, albumina e

imunoglobulinas, resultando na maior capacidade de colonização e infiltração do fungo, interferindo também na resposta imune do hospedeiro (NAGLIK et al., 2004).

2.3 *Syzygium cumini* (L.) Skeel

Originário da Índia, o jambolão adaptou-se muito bem às condições de solo e clima do Brasil, tornando-se espécie subespontânea na região Nordeste. Os frutos são tipo baga, muito parecidos às azeitonas; a frutificação ocorre de dezembro a maio, sua coloração quando madura é preta, as sementes ficam envolvidas por uma polpa carnosa e comestível, doce, mas adstringente, sendo agradável ao paladar (VIZZOTTO; FETTER; 2009).

O jambolão apresenta em sua composição diferentes moléculas de taninos, que quando presentes na dieta equilibrada com frutas e verduras são benéficas para a saúde humana. As propriedades antimicrobianas dos taninos são bem conhecidas e comprovadas, suas moléculas estão sendo testadas com a intenção de se descobrir uma droga eficiente contra o HIV (MONTEIRO et al., 2005).

As diferentes partes do jambolão são amplamente utilizadas na medicina popular. O caule e a casca do fruto possuem propriedades para controle de diabetes, atividade anticarcinogênica e anti-inflamatória. Os frutos também têm ação hipoglicemiante e uma alta atividade antioxidante, destaca-se a presença do ácido elágico que confere características antioxidantes e anticarcinogênicas (VIZZOTTO; FETTER, 2009).

Em estudo desenvolvido por Nascimento et al. (2000) verificou-se que, o *S. Cumini* apresenta um grande potencial antimicrobiano, frente a uma variedade de microrganismos, inibindo 57,1% das cepas testadas, sendo essas: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Proteus spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella spp.*, *Proteus spp.*, *Enterobacter aerogenes* e *Escherichia coli*.

Loguércio et al. (2005) avaliaram a atividade antimicrobiana de folhas de *S. cumini* frente a 17 isolados bacterianos, das seguintes espécies: *Staphylococcus ssp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Bacillus cereus*, *Corynebacterium*

ssp., *Rhodococcus equi*, *Streptococcus canis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus cholerasuis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus spp.*, dentre esses, Gram positivos e Gram negativos. Constatou-se 100% de inibição do crescimento sobre as bactérias testadas e os isolados bacterianos. Os autores chegaram à conclusão de que a atividade antimicrobiana do jambolão não apresentou diferença de sensibilidade entre microrganismos em relação aos Gram positivos e Gram negativos.

O fungo do gênero *Candida* e as espécies *albicans*, *dublinskiensis*, *parapsilosis*, *tropicalis*, *guilliermondii utilis*, *krusei*, *lusitaniae*, *glabrata* e *rugosa* de interesse clínico foram testadas a fim de verificar a atividade antifúngica de extrato diclometânico de sementes de *S. cumini*. Os resultados foram satisfatórios com Concentração Inibitória Mínima (CIM) variando entre 0.06 a 0.001 mg/mL indicando que novos agentes terapêuticos podem ser formulado a partir do Jambolão para inibir o crescimento de *Candida* (HÖFLING et al., 2010).

2.4 FITOCONSTITUINTES DO *Syzygium cumini*

Taninos, flavonoides, óleos essenciais, antocianinas e outros constituintes fenólicos são os compostos fitoquímicos mais encontrados no gênero *Syzygium* (MIGLIATO et al., 2007).

Os fitoconstituintes do *S. Cumini* tem sido amplamente estudado por vários autores, alguns compostos encontrados foram os seguintes: na casca do caule canferol, ácidos oleanólico, triterpenóides, quercetina, nos frutos antocianidinas e nas flores, o ácido oleanólico. Nas sementes taninos hidrolisáveis, quercetina, antimelina, óleo essencial, materiais resinosos, glicose; e por fim nas folhas que foi a parte estudada neste trabalho encontrou-se polifenóis totais, flavonoides, taninos e saponinas (MIGLIATO et al., 2006).

Os polifenóis, também conhecidos como composto fenólico compreende um grande grupo de moléculas presentes em frutas, hortaliças, vegetais, e algumas bebidas como café e vinho. No reino vegetal, tem por função a proteção das plantas, contra insetos e microrganismo, em alguns alimentos os compostos fenólicos conferem pigmentação, como também algumas características organolépticas, tais qual o sabor e odor. Sua estrutura química é basicamente derivada do benzeno com uma ligação a um

grupo hidrofílico. Os polifenóis são classificados em quatro famílias: flavonóides, ácidos fenólicos, lignanas e estilbenos, dependendo da forma que os anéis poli-fenólicos ligam-se uns aos outros. (MANACH, 2004).

Castro et al. (2012) afirmam que os polifenóis são altamente benéficos a saúde, dentre seus efeitos biológicos são válidos citar a inibição da proliferação celular, potencial antialérgico, atividade antimicrobiana, como também sua atividade antiinflamatória. A atividade antimicrobiana dos compostos fenólicos é devida a sua ação na parede celular dos microrganismos combinando-se assim com as suas adesinas, de forma a comprometer a adesão do microrganismo sobre a superfície celular.

Os flavonoides agem em vários processos, nas plantas é responsável pela coloração, proteção contra os raios Ultra Violetas, protege contra predadores e controla os hormônios vegetais e os ácidos fenólicos. Sua estrutura básica é formada por dois anéis aromáticos unidos por uma cadeia de três átomos de carbono. Dois tipos de flavonoides são responsáveis pela atividade antifúngica sendo eles a isoflavona e as flavonas (DASTIBAR, 2004; MENEZES, 2005).

Salas et al. (2011) afirmam que a eficácia dos flavonóides frente à leveduras, pode ser explicado, devido seu grande potencial em inibir a germinação de fungos patogênicos nas plantas, este argumento pode orientar os possíveis estudos sobre o mecanismo dos flavonoides no combate à infecções causadas por leveduras no homem. A formação de complexos entre flavonoides e as proteínas presentes nas paredes celulares dos fungos, como também a capacidade de romper membranas das leveduras, por causa da sua natureza lipofílica, pode explicar essa atividade antifúngica.

As saponinas apresentam em sua estrutura uma parte lipofílica e outra parte com características hidrofílicas está característica permite a formação de complexos com proteínas, fosfolípídeos e esteróides, de membranas resultando em alterações na permeabilidade e destruição celular, relacionado a este fenômeno anfílico (hidrofóbico-hidrofílico), estão à atividade hemolítica e fungicida (SARKER; NAHAR, 2009).

Quando as saponinas interagem com as moléculas de colesterol que compõe a membrana do eritrócito, ocorre à hemólise, esse fenômeno consiste na mudança da conformação da membrana, o que possibilita a entrada de água e íons dentro da célula,

resultando no seu rompimento e liberação de hemoglobina, por meio dessa atividade hemolítica, sendo esta uma possível explicação para a atividade antifúngica (SCHENKEL et al., 2001). As saponinas conferem a proteção do vegetal, frente ao ataque de insetos e microrganismos.

Os taninos condensados geralmente são encontrados em vegetais lenhosos, também podem ser denominados por proantocianidinas, pois apresenta em sua composição uma variação de pigmentos avermelhados, as moléculas de taninos variam muito estruturalmente e são compostos por polifenol, grupos carboxila e hidroxila, podendo liga-se a macromoléculas e proteínas (MONTEIRO et al., 2005).

As atividade biológicas dos taninos são extremamente promissoras, estudos apontam sua ação antimicrobiana, reparação de tecidos e regularização de proteínas e enzimas, grupos de taninos estão sendo estudados minuciosamente, tendo por finalidade encontrar uma droga efetiva contra o vírus HIV. A eficácia antifúngica ocorrem por meio dos seguintes processos: capacidade de formar complexos com polissacarídeos e proteínas, complexação com íons metálicos e atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres (BRUNET et al., 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Analisar o perfil fitoquímico e a atividade antifúngica do extrato bruto de folhas do *Syzygium cumini* (L.) Skeel sobre *Candida albicans*.

3.1 ESPECÍFICOS

- * Realizar um *Screening* fitoquímico do extrato liofilizado de folha de *Syzygium Cumini*, por meio da quantificação de compostos ativos, tais como polifenóis, flavonoides, saponinas e taninos;
- * Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do extrato de *S. cumini* sobre *Candida albicans*.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAL VEGETAL

As folhas foram obtidas a partir de árvore de *Syzygium cumini* L. Skeels (Myrtaceae), cultivadas na Chácara Flor do Campo, localizada na zona rural do Município de Campina Grande, Paraíba, coletadas em dezembro de 2012. Seco o material, uma amostra da planta foi enviada ao Herbário "Arruda Câmara", da Universidade Estadual da Paraíba, em Campina Grande, para identificação botânica e registro do exemplar, exsicata (1023). A secagem do material vegetal foi em estufa (FANEM – Modelo 330 /5), a 45°C até obter um teor de umidade de 20%. As folhas foram processadas em moinho de facas (SOLAB – Modelo SL 30). Em seguida, misturou-se o pó resultante com a solução hidroalcoólica (etanol 70%) pela técnica de percolação. Ao final, o extrato hidroalcoólico a 70% foi submetido à secagem por liofilização (liofilizador LS 3000_Terroni®).

4.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS, FLAVONÓIDES, SAPONINAS TOTAIS E TANINOS CONDENSADOS

4.2.1 Determinação de polifenóis totais

A determinação do teor de polifenóis totais seguiu a metodologia proposta por Chandra e Mejía (2004) com adaptações, através de espectroscopia na região do visível por meio do método de Folin-Ciocalteu. Submeteu ao estado de repouso por dois minutos, uma mistura de 1 mL da solução aquosa do extrato com 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 1N. Em seguida, 2mL de uma solução aquosa de Na₂CO₃ a 20% (p/v) foi adicionada, e a mistura permaneceu em repouso por mais 10 minutos. Por último, 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.

A curva de calibração foi obtida a partir de soluções de ácido gálico nas concentrações 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 de flavonóides totais

Meda et al. (2005) sugere um método para a quantificação de flavonóides totais, o qual foi aplicado nesta pesquisa. Obteve-se uma mistura de 5 mL de extrato dissolvido em metanol no mesmo volume de uma solução (em metanol) de Cloreto de Alumínio (AlCl_3) a 2% (p/v). Após 10 minutos de repouso, foi realizada a leitura da absorvância a 415 nm, contra um branco composto pela solução de AlCl_3 .

A determinação da curva de calibração foi obtida a partir de uma solução padrão a 100 $\mu\text{g/mL}$, preparada pela dissolução de 10 mg de quercetina em 100 mL de metanol. A amostra branca consistiu em metanol. O total de flavonóides foi determinado por meio da curva de calibração utilizando quercetina (Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) nas concentrações 2, 4, 6, 8, 10, 13, 16, 19, 22, 26, 28 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e expresso em mg equivalente de quercetina. As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.3 Determinação de saponinas totais

O teor de saponinas no extrato de *S. cumini* foi determinado utilizando o método descrito por Makkar; Siddhuraju e Becker (2007). A 250 μL da solução do extrato (em metanol 80%), adicionou-se 250 μL de uma solução de vanilina (8% em etanol) e 2,5 mL de ácido sulfúrico (72%). Os tubos foram incubados a 60°C em banho-maria por 10 minutos, sendo transferidos para um banho de gelo, onde permaneceram por quatro minutos. A leitura da absorvância foi feita em 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 $\mu\text{g/mL}$, 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 $\mu\text{g/mL}$. A concentração de saponinas foi expressa em miligramas equivalentes de disogenina. As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.4 Determinação de taninos condensados

A determinação do conteúdo de taninos condensados seguiu o método descrito por Makkar e Becker (1993). A 0,5 mL da amostra do extrato vegetal foi adicionado 3 mL de uma solução de vanilina (4% p/v em metanol); em seguida, adicionou-se 1,5 mL de ácido clorídrico (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 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 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

A partir do extrato liofilizado procedeu-se um *screening* microbiológico determinando a Concentração Fungicida Mínima (CFM) por meio da técnica de microdiluição em caldo descrita no documento Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2002). O extrato foi diluído em álcool 40% e testado na concentração de 4 mg/mL. Foram feitas triplicatas em três dias alternados para avaliar a reprodutibilidade do método.

4.3.1 Linhagem ensaiada

Foi selecionada cepa padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) disponibilizadas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – RJ): *Candida albicans* (ATCC 10231).

4.3.2 Meio de cultura

Para realização dos testes de sensibilidade dos microrganismos ao extrato vegetal preparado foi utilizado o caldo Sabouraud (HIMEDIA). Para a CFM, o meio de cultura Agar Sabouraud (HIMEDIA).

4.3.3 Preparo do inóculo

O preparo do inóculo para os testes de suscetibilidade foi realizado através do método de microdiluição seguindo as recomendações do protocolo M27-A2 para leveduras (CLSI, 2002). A concentração do inóculo, após ajuste em espectrofotômetro (530nm), corresponde a 5×10^6 UFC/mL e, após diluições sucessivas, $2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) PELO MÉTODO DA MICRODILUIÇÃO

Foram distribuídos nos orifícios de cada coluna, 100 µL do caldo Sabouraud para fungo. Na coluna 1 - linha A foram acrescentados 50 µL (micropipeta Eppendorf, Research plus, 20-200 µL) de solução da amostra testada, de concentração conhecida, sendo estes referentes ao controle de esterilidade das amostras. Em seguida, na linha B foram adicionadas 100 µL dos extratos para em seguida efetuar uma diluição seriada nos poços consecutivos, retirando-se 100 µL do poço de maior concentração para o poço seguinte. Os 100 µL finais foram desprezados.

A partir das suspensões padrões de *Candida albicans* foram pipetados 100 µL dessa suspensão em cada poço. As primeiras colunas correspondem ao controle positivo e nistatina 100.000 UI/mL e controle negativo (o diluente do extrato, no caso, álcool 40%).

As placas foram incubadas por 48 horas a 36 °C em atmosfera anaeróbia, microaerofilia (CLSI, 2002).

4.4.1 Leitura dos resultados da CIM

Foram adicionados 20 mL da solução de cloreto de resazurina 0,01% (Sigma Aldrich Chemistry) após o período de incubação e as placas re-incubadas por 40 minutos. A CIM foi definida como a menor concentração da amostra, capaz de impedir o aparecimento de coloração vermelha, conferida ao meio quando as células apresentam atividade respiratória (CLSI, 2002).

4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

Determinada a CIM dos extratos pôde-se confirmar a atividade fungicida dos mesmos através da determinação da CFM, por meio de plaqueamento por superfície do material do poço correspondente à CIM e concentrações anteriores a este, em meio de cultura específico. As placas foram submetidas à incubação a 35°C +- 1°C, durante 48 horas, para crescimento de *C. albicans* (CLSI, 2002).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS, FLAVONOIDES, SAPONINAS TOTAIS E TANINOS CONDENSADOS

A caracterização química das espécies vegetais, com determinação dos grupos de metabólitos secundários, é considerada uma abordagem desafiadora. Porém, em função da complexidade química é de extrema importância, visto que plantas medicinais dispõem de uma fonte rica de substâncias, o que prediz valores terapêuticos, envolvidos principalmente com atividade antimicrobiana e antioxidante (JEON et al., 2011; NEWMAN; CRAGG, 2007). Os mais importantes fitocompostos encontrados e que estão relacionados com essas atividades terapêuticas são compostos fenólicos, flavonoides, saponinas e taninos (PANCHAVARNAKILI et al., 2012). Neste estudo, o composto fitoquímico que apresentou maior concentração no extrato liofilizado de folhas de *S. cumini* foram saponinas, seguido pelos polifenóis, taninos e flavonoides (tabela 1).

Na literatura, pesquisas fitoquímicas, de caráter quantitativo com folhas de *S. cumini* são escassos, Kaneria et al. (2009) estudaram os componentes fitoquímicos de folhas, qualitativamente. Foi observado que a presença de taninos prevaleceu em relação à de saponina, com uma diferença discreta, contradizendo o presente estudo, visto que, neste, o teor de saponinas foi 94% maior que o de taninos. No entanto, os resultados do presente estudo mostram-se mais seguros, uma vez que, além de identificar a presença marcante de saponinas no extrato, a concentração desse composto ativo é expressa em miligramas equivalentes de disogenina, seu padrão de referência. Vale ressaltar, nesse estudo, a importância de se ter quantificado no extrato de folhas de jambolão, a presença marcante de saponinas, metabólito secundário, que constitui uma das classes de maior destaque devido a sua ampla distribuição no reino vegetal e suas importantes atividades biológicas, dentre elas antibacteriana, antifúngica (DINIZ, 2006; KAISER; PAVEI; ORTEGA, 2010).

Tabela1. Composição química do extrato liofilizado de folhas de *S. cumini* L. Skeel obtidos por espectroscopia na região do visível.

COMPOSTO	Polifenóis	Flavonoides	Saponinas	Taninos condensados
TEOR (mg/g)	100,10 ± 39,97	23,04 ± 3,02	820,35 ± 225,38	54,26 ± 0,39

* mg de equivalentes do padrão de referência por g de extrato.

Estudo quantitativo semelhante a este foi realizado por Luzia; Jorge (2009) e fornece dados de que a concentração de polifenóis totais encontrada em extrato etanólico de sementes de *S. cumini* (130,56 mg) foi concordante ao encontrado no presente estudo (100,10 ± 0,39 mg/g) com folhas. Neste estudo, a concentração mostrou-se um pouco menor, o que indica que há pouca diferença entre a composição desse composto ativo entre sementes e folhas. É conhecido que polifenóis podem apresentar atividade antimicrobiana, pois agem sobre a parede celular dos microrganismos combinando-se assim com as suas adesinas, de forma a comprometer a adesão do microrganismo sobre a superfície celular (CASTRO et al., 2012).

A atual pesquisa revela um valor de taninos bem maior em folhas, representando 54,263± 0,39 mg/g de extrato, comparando-se ao trabalho realizado por Saha; Zaman; Roy (2013) em suco, polpa do fruto e sementes (6.9mg/g, 20.7mg/g e 21.0mg/g, respectivamente). O mesmo estudo ainda determina o teor de flavonóides em extrato metanólico de sementes e suco do fruto de jambolão, revelando que o valor desse composto na atual pesquisa mostrou-se bem menor, comparando-se ao encontrado por esses autores em extrato metanólico de sementes, com teor de 715 mg/g. Em contrapartida, mostrou-se maior (23,043 ± 3,02 mg/g) que o suco do fruto de jambolão (10mg/mL) determinado por Saha; Zaman; Roy (2013).

5.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM), E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

Pouco é descrito na literatura sobre a atividade antifúngica do extrato liofilizado de *Syzygium cumini*, pela técnica de microdiluição. Para *Candida albicans* o extrato apresentou um grande potencial de inibição de crescimento, com CIM de 62,5 µg/mL, mostrando-se fungistático e fungicida conforme apresentado na Tabela 2.

Os controles positivos e negativos mostraram-se efetivos, não houve contaminação dos extratos nem dos meios de cultura, o álcool a 40% não apresentou inibição fúngica e a CIM do controle positivo foi de 15,6 µg/mL, para nistatina.

Optou-se neste estudo pela classificação de Aligiannis et al. (2001), que propõe a classificação de produtos naturais baseada nos resultados da CIM. Inibidores potentes: CIM até 500 µg/mL; inibidores moderados: CIM entre 600 e 1500 µg/mL; inibidores fracos: CIM acima de 1600 µg/mL.

Tendo em vista esta classificação e diante dos resultados apresentados, *S. Cumini* apresentou-se como um inibidor potente frente à *Candida albicans*. A candidose bucal é uma infecção oportunista, tendo por agente etiológico leveduras do gênero *Candida*, sendo a *Candida albicans* a maior responsável por desencadear as afecções bucais. Esse resultado mostrou-se importante para dar embasamento científico ao uso popular, visto que o *Syzygium cumini* já é utilizada na medicina popular para tratar ulcerações, afecções da garganta e outras doenças da cavidade bucal (COSTA et al., 2009).

As Concentrações Fungicidas Mínimas foram determinadas apenas para os extratos que apresentaram atividade frente à cepa testada. A CFM sugere que *S. cumini* é fungicida nas concentrações de 250 µg/mL, 125 µg/mL e 62,5 µg/mL.

Tabela 2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos extratos liofilizados de folhas de *S. cumini* de três análises (I, II e III) em dias alternados.

Réplicas	CIM ($\mu\text{g/mL}$) e CFM ($\mu\text{g/mL}$)
	Microrganismo
	<i>Candida albicans</i>
I	62.5
II	62.5
III	62.5
CIM	62.5 \pm 0
CFM	62.5

Controle: CIM = 15,6 $\mu\text{g/mL}$ nistatina

Desse modo, os resultados apresentados neste estudo indicam que *S. cumini* é efetivo sobre fungos, corroborando com o estudo desenvolvido por Chandrasekaran; Venkatesalu, (2004). Os autores testaram *S. cumini* frente a bactérias Gram positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*), Gram negativas (*Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*) e cepas fúngicas (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus sp.*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum gypseum*). A atividade antimicrobiana mostrou que dentre os microrganismos testados, apenas duas cepas bacterianas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*) foram sensíveis ao extrato, enquanto que para fungos, quatro espécies fúngicas (*Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*) apresentaram inibição do crescimento.

A atividade antifúngica enfatiza que os resultados desta pesquisa mostraram-se semelhantes aos apresentados por Oliveira (2007), o qual foi realizado por meio de técnica de macrodiluição em meio ágar sólido (discos e poços) com extrato hidroalcoólico de folhas do jambolão frente *Candida albicans*. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) realizada por microdiluição variou de 70 a 200 $\mu\text{g/mL}$, mostrando um pouco superior ao apresentado nesta pesquisa, indicando atividade

antifúngica em ambos os estudos, especialmente mais potente neste estudo, com CIM de 62,5 µg/mL, considerada atividade forte do extrato frente ao crescimento fúngico.

Em outro estudo, realizado por Höfling et al. (2010), para avaliar a atividade antifúngica de extratos diclorometânico e metanólico de sementes de *S. cumini* frente a *C. albicans* revelou CIM's de 30 µg/mL e 1 µg/mL, respectivamente, mostrando-se maior atividade antifúngica de sementes com esses solventes extratores do que em folhas com solução hidroalcoólica a 70% para dar origem ao extrato liofilizado, como foi realizado nesse trabalho. No entanto, apesar de sementes terem apresentado melhor atividade antifúngica conforme Hofling et al. (2010), esses solventes são mais tóxicos para o organismo humano. Assim, pode-se enfatizar que os atuais resultados para folhas revelam melhor segurança e eficácia.

A bioprospecção por meio de estudos com essa espécie vegetal deve ser continuada, objetivando no futuro, o desenvolvimento de um fitoterápico adjuvante ao tratamento de candidoses resistentes à terapia convencional.

6 CONCLUSÃO

A quantificação dos fitoconstituintes do extrato liofilizado da folha de *Syzygium cumini* L. Skeel obteve resultados expressivos, podendo justificar o efeito antifúngico encontrado, especialmente devido a altas concentrações de polifenóis totais e saponinas;

Baseado nos resultados da CIM e CFM, folhas de *S. cumini* têm atividade fungistática e fungicida para *C. albicans*, visto que, na concentração em que inibiu o crescimento também conseguiu causar a lise de células fúngicas e, conseqüentemente, morte celular.

REFERÊNCIAS

- AFIFY, AEMMR, et al. *Syzygium cumini* (pomposia) active principles exhibit potent anticancer and antioxidant activities. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n.7, p. 948-956, July, 2011.
- AGUIAR, M. M. G. B. **Desenvolvimento de novos comprimidos bucais de Nistatina para o tratamento de Candidíase Oral**. 2007. 146f. Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas)- Faculdade de farmácia. Universidade Federal do *Rio de Janeiro*, Rio de Janeiro, 2007.
- AL-ABEID H. M.; ABU-ELTEEN, K. H.; ELKARMI A. Z.; HAMAD, M. A. Isolation characterization of *Candida* spp. in Jordanian cancer patients: Prevalence, pathogenic determinants, and antifungal sensitivity. **Japanese Journal of Infectious Diseases** v. 57 p.279-284,2004
- ALIGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 4168-4170, 2001.
- BASTOS, J.A., et al. Identification of periodontal pathogens and severity of periodontitis in patients with and without CKD. **Archives of Oral Biology** ; v.10, n. 16, p.1-8, 2010.
- BONIFAIT, L.; et al.,. Synthesis and antimicrobial activity of geranyloxy- and farnesyloxy-acetophenone derivatives against oral pathogens. **Fitoterapia**, Canadá, v. 83, p. 996–999, 2012.
- BRUNET, J. R. et al., Inhibición de la replicación del virus de inmunodeficiencia humana por extractos de taninos de *Pinus caribaea* Morelet, **Revista Cubana de farmácia**, v. 37 n. 2 , 2003.
- CASTRO, L. C. de. Avaliação da atividade antimicrobiana de extrato aquoso e etanólico de *Acanthospermum australe*. **Caderno pedagógico**, Lajeado, v. 9, n. 2, p. 153-161, 2012.
- CHANDRA, S.; MEJÍA, E. G. 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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3583-3589, 2004.
- CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESALU, V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, India, v. 91, p. 105–108, mar. 2004.
- CHASE MW., REVEAL JL. A phylogenetic classification of land plants to accompany APG III. **Botanical Journal of Linnean Society**; v. 161: 122-127, 2009.

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.

COSTA, A. C. B. P. da; PEREIRA, C. A.; FREIRE, F.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C. 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, mar./abr. 2009.

DASTIBAR S. G. et al. Studies on the antibacterial potentiality of isoflavones **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, p.99-102, 2004.

DONGARI- BAGTZOGLOU, A.; FIDEL Jr. The host cytokine responses and protective immunity in oropharyngeal candidiasis. **Journal of Dental Research**, v. 84, n.11, p. 966-977, 2005.

DINIZ, L. R. L. **Efeito das saponinas triterpênicas isoladas de raízes da *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke sobre a função renal.** 2006. 116 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Farmacologia) - Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

FARAH, C. S.; LYNCH, N.; McCULLOUGH, M. J. Oral fungal infections: an update for the general practitioner. **Australian Dental Journal**, v.55, n.1, p.48-54, 2010.

GONZALEZ, G. M. et al. Trends in species distribution and susceptibility to seven antifungal agents of bloodstream isolates of *Candida* in Monterrey, Mexico. Results of a 3-Year (2004-2007). Surveillance Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p.2902-2905, 2008.

JEON, J.-G. ; ROSALEN, P. L. ; FALSETTA, M. L. ; KOO, H. . Natural products in caries research: Current (limited) knowledge, challenges and future perspective. **Caries Research (Online)**, v. 45, p. 243-263, 2011.

JESUS, R. P. F. S. et al. Ação antibacteriana e antiaderente de *Pithecellobium cochliocarpum* (gomez) Macbr sobre microrganismos orais. **Odontologia Clínica-Científica (Online)**, v.9, n.4, 2010.

HÖFLING, J. F. Evidências científicas da colonização de *Candida* spp. em bolsas periodontais. **Revista da Faculdade de Odontologia – UPF**, Passo Fundo, v.15, n.2, p. 145-151, 2010.

KANERIA, M.; BARAVALIA, Y.; VAGHASIYA, Y.; CHANDA, S. Determination of antibacterial and antioxidant potential of some medicinal plants from Saurashtra Region. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.71, n. 4, p. 406–412, 2009.

KAISER, S.; PAVEI, C.; ORTEGA, G. G. Estudo da relação estrutura-atividade de saponinas hemolíticas e/ou imunoadjuvantes mediante uso de análise multivariada. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.20, n.3, jul. 2010.

KAWECKYJ, N. Eastern medicine meets dentistry: the use of herbal supplements in dentistry today. Continuing education course at dental care. Revised December, p. 15-17, 2010.

KLOTZ, S.A.; LIPKE, P. The Perfect Adhesive. **Current research, technology and education topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, v. 16, p. 838-844, 2010.

KULETA, J. K.; KOZIK, M. R.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Bichimica Polonica**, v. 56, n. 2, p. 211–224, 2009.

LORENZI, H. E.; MATOS, F.J. DE A. Plantas medicinais no Brasil/ Nativas e exóticas. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, v.1, n. 2, 2002.

LOGUÉRCIO, A. P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A. C.; HENZEL, A.; WITT, N. M. Atividade antibacteriana de extrato hidroalcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* L. Skells, **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 371-376, 2005.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Composição centesimal, potencial antioxidante e perfil dos ácidos graxos de sementes de jambolão (*Syzygium cumini* L.). **Revista Ciência Agrônômica**, v. 40, n. 2, p. 219-223, abr./jun. 2009.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Vanillin-HCl method for condensed tannins: Effect of organic solvents used for extraction of tannins. **Journal of Chemical Ecology**, n. 4, v. 19, 1993.

MAKKAR, HARINDER P. S.; SIDDHURAJU, P.; BECKER, Klaus. **Plant Secondary Metabolites**. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2007.

MANACH, C. et al. "Polyphenols: food sources and bioavailability". **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, p.727-47, 2004.

MEDA, A. et al., Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, p. 571-577, 2005.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, p. 405-411, 2005.

MENEZES, E.A.; AUGUSTO, K.L.; FREIRE, C.C.F., et al. Frequência e atividade enzimática de *Candida spp.* na cavidade oral de pacientes diabéticos do serviço de endocrinologia de um hospital de Fortaleza-CE. **Jornal Brasileiro Patologia Medicina Laboratorial**, v.43, n.4, ago., p.241-244, 2007.

- MONTEIRO et al., Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n.5, p.892-896, 2005.
- MIGLIATO, K. F.; BABY, A. R.; ZAGUE, V.; VELASCO, M. V. R.; CORRÊA, M. A.; SACRAMENTO, L. V. S.; SALGADO, H. R. N. Ação farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.25, p.310-314, 2006.
- MIGLIATO, K. F.; MOREIRA, R. R. D.; MELLO, J. C. P.; SACRAMENTO, L. V. S.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, n.1, p.94-101, 2007.
- MONTEIRO, J. M. et al. Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpátricas da caatinga. **Revista Árvore**, v. 29, n. 6, p. 999-1005, 2005.
- NAGLIK, J, et al., Candida albicans proteinases and host/pathogen interactions. **Cellular Microbiology**, v. 6, p. 915–926, 2004.
- NASCIMENTO, B. C.; ANDRADE, P. M. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de antissépticos bucais. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v.8, n.2, p.153-161, mai./ago. 2009.
- NEVILLE, B.W.; DAMM, D.D.; ALLEN, C.M.; BOUQUOT, J.E. Patologia Oral e Maxilofacial. Trad.3a Ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2009, 972p.
- NEWMAN D.J., CRAGG G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v.70, p.461–477, 2007.
- NIEWERTH, M.; KORTING, H. C. Phospholipases of *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 44, n. 9-10, p. 361-367, 2001.
- OLIVEIRA, G. F. de; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA FILHO, A. A.; MARTINS, C. H. G.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A. Antimicrobial activity of *Syzygium cumini* (Myrtaceae) leaves extract. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 2, jun. 2007.
- PANCHAVARNAKILI, N. et al. Antimicrobial studies and phytochemical screening of stem bark in *Syzygium cumini* (L.) and *Lannea coromentalis* Houtt (Merr.). **Asian Journal of Plant Science and Research**, Estados Unidos, v. 2, n. 2, p. 89-94, 2012.
- PINTO, P.M. **Caracterização fenotípica e análise da variabilidade genética de espécies do gênero *Candida* isoladas de pacientes portadores ou não de doenças de base**. Belo Horizonte, 2003. Tese (Doutorado em Ciências Médicas). ICB-UFMG, Belo Horizonte.
- RODRIGUES, G. M. C. et al. Estudo de colonização por *Candida* sp. na cavidade oral de indivíduos soropositivos e soronegativos para HIV-1 no noroeste Paulista, Brasil. **Revista Panamericana de Infectología**, v. 9, n. 3, p. 26-31, 2007.

ROSSI, T. de; LOZOVYOY, M. A. B.; SILVA, R. V. da; FERNANDES, E. V.; GERALDINO, T. H.; COSTA, I. C.; SARIDAKIS, H. O.; WATANABE, M. A. E.; FELIPE, I. Interações entre *Candida albicans* e hospedeiro. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, n. 1, p. 15-28, 2011.

RUNYORO, D. K. B.; NGASSAPA, O. D.; MATEE, C. C. Medicinal plants used by Tanzanian traditional healers in the management of *Candida* infections. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p.158-165, 2006.

SAHA, R. K.; ZAMAN, N. M.; ROY, P. Comparative evaluation of the medicinal activities of methanolic extract of seeds, fruit pulps and fresh juice of *Syzygium cumini* *in vitro*. **Journal of Coastal Life Medicine**, v. 1, n. 4, p.: 300-308, 2013.

SALAS, P.M. et al., Antifungal activity and enzymatically – modified flavonoids isolated from citrus species. **Food Chemistry**, v.124, p. 1411 – 1415, 2011.

SAMSON N.G. Managing patients with oral candidiasis. **Journal of the Canadian Dental Association**, v. 79, n.122, 2013SCHENKEL, E. P. et al., Farmacognosia: da planta ao medicamento .3 ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, 2001. cap. 27, p. 597-619. fitoterapia: na atenção primária à saúde.

SARKER, S.D; NAHAR, L.; **Química para estudantes de Farmácia: Química Geral, Orgânica e de Produtos Naturais**.Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

SASIDHARAN, S . Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Plants' Extracts. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative**, v.8, n.1, p.1-10, 2011.

SOBEL JD. Factors involved in patient choice of oral or vaginal treatment for vulvovaginal candidiasis. **Dovepress**, v.8, p.31-34, 2013.

SIMOES, A. C. P. et al., “Ellagic Acid Derivatives from *Syzygium cumini* Stem Bark: Investigation of Their Antiplasmodial Activity,” **Natural Product Communications**, v. 4, n. 10, p. 1371- 1376, 2009.

VIZZOTTO, M.; FETTER, M. R. Jambolão: o poderoso antioxidante. Embrapa Clima Temperado. Artigo de Divulgação na Mídia. Publicado em 2009. Disponível em: http://www.cpact.embrapa.br/imprensa/artigos/2009/jambolao_Marcia.pdf. Acesso em: 05 de maio de 2015.

WINGETER, M. A. et al. Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isolada da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 272-276, 2007.

XU, L.; ZHANG, H.; LIU, J.; CHEN, X. Investigation of the oral infections and manifestations seen in patients with advanced cancer. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v.29, n.5, p.1112-1115, 2013.