



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE/PB
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
CURSO DE ODONTOLOGIA**

RAÍSSA BRAZ DE MACÊDO

**ATIVIDADE ANTI-CANDIDA DO EXTRATO DE *Syzygium cumini* (Linn.)
Skeels SOBRE *Candida* spp**

**CAMPINA GRANDE/PB
2019**

RAÍSSA BRAZ DE MACÊDO

**ATIVIDADE ANTI-CANDIDA DO EXTRATO DE *Syzygium cumini* (Linn.)
Skeels SOBRE *Candida* spp**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientadora: JOZINETE VIEIRA PEREIRA MARQUES

**CAMPINA GRANDE/PB
2019**

É expressamente proibido 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 do trabalho.

M134a Macêdo, Raissa Braz de.
Atividade anti-candida do extrato de *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels sobre *Candida* spp [manuscrito] / Raissa Braz de Macedo. - 2019.
31 p. : il. colorido.
Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde , 2019.
"Orientação : Profa. Dra. Jozinete Vieira Pereira Marques , Departamento de Odontologia - CCBS."
1. Candida. 2. Fitoterapia. 3. Atividade antifúngica. I. Título
21. ed. CDD 617.6

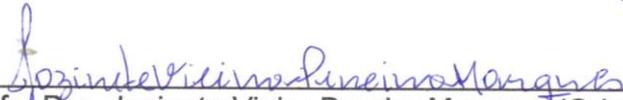
RAÍSSA BRAZ DE MACÊDO

**ATIVIDADE ANTI-CANDIDA DO EXTRATO DE *Syzygium cumini* (Linn.)
Skeels SOBRE *Candida* spp**

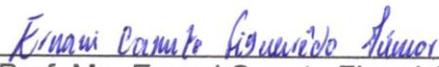
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Aprovado em: 12 / 06 / 2019 .

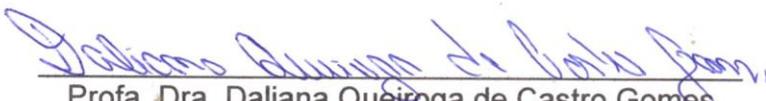
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Jozinete Vieira Pereira Marques (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Me. Ernani Canuto Figueirêdo Júnior
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profa. Dra. Daliana Queiroga de Castro Gomes
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

**Nada te pertube, Nada te espante,
Tudo passa, Deus não muda,
A paciência tudo alcança;
Quem a Deus tem, Nada lhe falta:
Só Deus basta.**

(Santa Tereza D`ávila)

AGRADECIMENTOS

À Deus e Nossa Senhora que me permitiram chegar até aqui, me dando forças, discernimento e sabedoria durante toda essa caminhada, me tornando uma pessoa realizada na profissão que escolhi para exercer por toda a minha vida.

Aos meus Pais, Augusto e Walkíria, pelo suporte constante e sem medidas, sem vocês não sou, serei sempre grato.

Aos meus avós *in memoriam* Oscar Severo, Augusto Filho e Zélia Braz por fazerem parte da minha vida e em vida sempre felizes com minhas vitórias.

À minha avó Lúcia, meus tios João, Zélia, Vanuska, Heloísa, Luciana, Frutuoso, Alcivone, Eliane e Marcos pelas constantes orações e incentivos.

A toda minha família, que tanto torce por mim e se alegra com minhas conquistas, em especial minha prima Laís Ribeiro Vieira.

À minha orientadora Professora Doutora Jozinete Vieira Pereira Marques, pela paciência na orientação, por tantos ensinamentos, incentivo, estímulo, e pela amizade.

Ao grupo de pesquisa, Ernani, Waleska, Andressa, Bruna e Julliana, por toda a ajuda, dúvidas compartilhadas e trabalho em equipe.

A Professora Doutora Edja Maria Melo de Brito Costa pela acolhida no laboratório, além do carinho para comigo.

À Universidade Estadual da Paraíba pelas sempre portas abertas, oportunidades, ensinamentos e conhecimentos oferecidos para conclusão do curso.

Ao Programa de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) UEPB e Cnpq, pelas oportunidades e ensinamentos ao longo da graduação.

Aos professores e funcionários do Departamento de Odontologia pelos sorrisos e presteza sempre que precisei.

Aos meus colegas de turma, em especial meus amigos Kelvin Câmara, Graziely Lima, Tayná Ribeiro, Thayná Tavares e Wanúbia Nunes por todos os percalços enfrentados juntos, ombro amigo, abraço de família e pela amizade firmada.

À minha dupla, Kelvin Pablo Câmara, por dividir comigo durante todos esses anos medos, dúvidas e conquistas, dentro e fora da Universidade.

Aos meus amigos, em especial Janine Vicky, Renata Fernandes, Camilla Guedes, Beatriz Pinheiro, Taiane Oliveira, Antonio Carneiro e Thatiane Barboza, que não estiveram diretamente ligados a este trabalho, porém sempre são fonte de alegria e pessoas especiais para mim.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade anti-*Candida* do extrato hidroalcoólico de folhas de *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels sobre *Candida* spp. O espécime vegetal encontra-se depositado na Coleção do Herbário Professor Lauro Pires Xavier, e identificado com o número voucher: JPB 58.543. O extrato hidroalcoólico foi obtido pelo método de percolação das folhas da planta. A análise da atividade antifúngica do extrato foi determinada pela Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Fungicida Mínima (CFM) sobre *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida glabrata* (ATCC 90030) e associação entre *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Candida glabrata* (ATCC 90030) e através de ensaios do extrato sobre a cinética de crescimento de *Candida albicans* (ATCC 10231). Os dados do ensaio do extrato sobre cinética de crescimento de *C. albicans* foram avaliados através do teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, admitindo-se um valor de $\alpha=0,05$. O extrato demonstrou valores de CIM entre 62 e 125 $\mu\text{g/mL}$, e CFM entre 1000 e $>1000 \mu\text{g/mL}$, com efeito fungistático sobre as cepas testadas. Na análise da determinação do efeito do extrato sobre a cinética de crescimento de *Candida albicans*, observou-se que a exposição dos microrganismos à concentração do extrato equivalente a CIM (125 $\mu\text{g/mL}$) apresentou menor valor de média de número de UFC/mL no período de quatro horas. No entanto, houve diferença significativa ($p=0,001$) entre o resultado obtido com o extrato e a nistatina em período de tempo igual ou superior a oito horas de exposição à *C. albicans*. Assim, de acordo com os resultados da atividade antifúngica do extrato de *Syzygium cumini*, sugere-se mais investigações utilizando essa planta na perspectiva do desenvolvimento de produtos com finalidade terapêutica alternativa e complementar de uso odontológico.

Palavras-Chave: *Syzygium jambolanum*. *Candida*. Fitoterapia.

ABSTRACT

The objective of this study was to assess the anti-*Candida* activity of the hydroalcoholic extract of *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels on strains of the genus *Candida* spp. The vegetal specimen finds itself stored in Coleção do Herbário Professor Lauro Pires Xavier, and identified with the voucher number: JPB 58.543. The hydroalcoholic extract was obtained by the percolation method of the leaves of the plant. The analysis of the antifungal activity of the extract was determined by the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Fungicidal Concentration (MFC) on *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida glabrata* (ATCC 90030) and the association between *Candida albicans* (ATCC 10231) and *Candida glabrata* (ATCC 90030) and by assaying the extract on the growth kinetics of *Candida albicans* (ATCC 10231). The extract assay data on *C. albicans* growth kinetics were evaluated using the ANOVA test followed by the Tukey post-test, assuming a value of $\alpha = 0.05$. The extract showed MIC values between 62 and 125 $\mu\text{g} / \text{mL}$, and MFC between 1000 and $> 1000 \mu\text{g} / \text{mL}$, with a fungistatic effect on the strains tested. In the analysis of the determination of the effect of the extract on the growth kinetics of *Candida albicans*, it was observed that the exposure of the microorganisms to the concentration of the extract equivalent to MIC (125 $\mu\text{g} / \text{mL}$) presented a lower average number of CFU / mL in the period of four hours. However, there was a significant difference ($p = 0.001$) between the result obtained with the extract and nystatin in a time period equal to or greater than eight hours of exposure to *C. albicans*. Thus, according to the results of the antifungal activity of the extract of *Syzygium cumini*, it is suggested more investigations using this plant in the perspective of the development of products with alternative therapeutic purpose and complementary of dental use.

Key words: *Syzygium jambolanum*. *Candida*. Phytotherapy.

LISTA DE FIGURA

Figura 1. Efeito do extrato das folhas de <i>Syzygium cumini</i> e Nistatina sobre a cinética de crescimento de <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231).....	24
---	----

LISTA DE TABELA

Tabela 1- Atividade antifúngica do extrato das folhas de <i>Syzygium cumini</i> (Linn.) Skeels e de fármacos padrão sobre fungos do gênero <i>Candida</i> (valores de CIM e CFM expressos em $\mu\text{g/mL}$).....	23
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - Análise de variância
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
UFPB- Universidade Federal da Paraíba
mg - Miligramas
ml- Mililitro
NaCl - Cloreto de Sódio
pH - Potencial de Hidrogênio
µg - Micogramas
µL - Microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Fungos do gênero <i>Candida</i> : candidose e a terapêutica antifúngica atual.....	14
2.2 Utilização popular de plantas medicinais como modalidade terapêutica alternativa.....	15
2.3 Considerações sobre <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeel	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Delineamento do estudo.....	18
3.2 Local da pesquisa.....	18
3.3 Processamento do material vegetal.....	18
3.4 Produção do extrato.....	19
3.5 Microrganismos envolvidos e preparo do inóculo.....	19
3.6 Reativação dos microrganismos.....	19
3.7 Determinação da atividade antifúngica.....	20
3.8 Determinação do efeito do extrato sobre cinética de crescimento de <i>C. albicans</i>	21
3.9 Análise estatística.....	22
4 RESULTADOS	23
5 DISCUSSÃO	25
6 CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

A incidência de infecções fúngicas ao longo das três últimas décadas teve um grande aumento na sua prevalência, devido ao crescente do número de pacientes imunocomprometidos. Essas doenças podem variar de acordo com as condições socioeconômicas, regiões geográficas, hábitos culturais e o número de indivíduos portadores de condições de risco para a aquisição dessas infecções (GIACOMAZZI et al, 2016).

Essas infecções são consideradas oportunistas, tornando-se um grave problema de saúde pública, associadas a problemas de imunossupressão sendo frequentes em ambientes hospitalares. Dentre as infecções fúngicas oportunistas, a candidose é a mais frequente, causada por fungos do gênero *Candida* como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei* (SANTOS, 2011). Sendo a candidose bucal uma infecção superficial que apresenta formas clínicas variáveis, como candidose pseudomembranosa; candidose eritematosa; candidose hiperplásica e queilite angular (LOPES, 2006; MUADCHEINGKA; TANTIVITAYAKUL, 2015).

A limitação de agentes antimicrobianos para o tratamento de infecções provocadas por micobactérias, bactérias e fungos tem gerado a necessidade de uma busca por novas substâncias eficazes contra esses microrganismos. Entre elas as plantas vem desempenhando um papel de destaque, sendo consideradas possíveis novas fontes para a descoberta de medicamentos, devido a sua utilidade fitoterápica e como fonte de novas substâncias bioativas com ação antimicrobiana (REIS et al, 2015).

O uso de produtos naturais na Odontologia vem sendo um meio terapêutico promissor no campo farmacológico, visto que apresenta-se como uma alternativa viável, resultando em uma capacidade de causar menos efeitos adversos do que os medicamentos sintéticos e apresentando várias propriedades terapêuticas devido à presença de metabólitos secundários. Além disso pode ser utilizada também para inibir o crescimento do biofilme dentário sendo eficaz na prevenção e combate de diversas doenças da cavidade bucal (JESUS et al, 2010; NWODO et al, 2011; FREIRES et al, 2010).

Syzygium cumini (L.) Skeels é uma planta da família *Myrtaceae* nativa da região tropical da Índia, no continente asiático e naturalizada no Brasil. Planta conhecida popularmente como jambolão, jamelão, azeitona doce, jambul ou oliveira (VIZZOTO; FETTER, 2009).

Dentre as propriedades medicinais do *S. cumini*, há relatos que chamam atenção para a aplicação na Odontologia, a exemplo da utilização do fruto através de gargarejos para irritações da orofaringe (MIGLIATO et al, 2006); utilização da casca como antisséptico, adstringente em ulcerações bucais e estomatite (LOGUERCIO et al, 2005; MIGLIATO et al, 2006).

Nesse sentido, em virtude do crescente destaque que vem sendo dada à utilização de terapias complementares e sobre tudo fitoterápicos, inclusive para o uso odontológico, direciona-se para a necessidade da realização de pesquisas buscando avaliar e comprovar os efeitos de diferentes plantas para o tratamento de afecções bucais (OLIVEIRA et al, 2007). As propriedades descritas na literatura de acordo com Pereira et al (2016) acerca do *S. cumini* motivaram a seleção desta planta como alvo da pesquisa realizada. Diante do exposto esse trabalho tem como objetivo avaliar a atividade anti-Candida do extrato hidroalcoólico das folhas de *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels sobre *Candida spp.*

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fungos do gênero *Candida*: candidose e a terapêutica antifúngica atual

Dentre as infecções fúngicas oportunistas, a candidose é a mais prevalente, causada por fungos como *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei* (SANTOS, 2011). As leveduras que causam a candidose fazem parte da microbiota bucal, no entanto, tornam-se patogênicas em casos de imunodeficiência congênita ou adquirida e imunossupressão induzida pelo estresse grave (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Candida albicans é um desses constituintes saprófitas que habitam comumente na microbiota bucal humana, porém quando a homeostase entre este microrganismo e células hospedeiras é interrompida, torna-se um patógeno com sobre crescimento na pele e nas superfícies mucosas (SOUZA-JÚNIOR et al, 2011, KIM, 2016). Dessa forma, o epitélio da mucosa é destruído pela sua proliferação excessiva ocorrendo a candidose (ZHOU; HUA; LIU, 2017).

O espectro clínico da candidose é muito amplo, abrangendo desde manifestações leves, como a colonização de mucosas, até quadros sistêmicos com a invasão de vários órgãos (COUTINHO, 2009). Geralmente desenvolve-se nas membranas mucosas da boca, do trato intestinal e geniturinário, causando infecções devido ao supercrescimento oportunista, quando a microbiota competitiva é suprimida por antibióticos ou outros fatores (TORTORA et al, 2005).

As manifestações clínicas da candidose podem ocorrer de diversas formas e dividem-se em candidose invasiva ou sistêmica e candidose mucocutânea (que pode dividir-se em candidose bucal, intertriginosa, balanoprepucial, vulvovaginal, paroníquia e mucocutânea crônica) (LOPES, 2006).

Antifúngicos sintéticos comercialmente disponíveis para tratamento de infecções fúngicas, apresentam algumas limitações de uso, evidenciadas pelos efeitos adversos causados aos usuários (SANTOS, 2011), bem como pelo aumento da resistência dos microrganismos, decorrentes do uso indiscriminado (BANSOD; RAI, 2008). Sendo assim, tem sido gerada uma necessidade de uma busca por novas substâncias fungicidas (REIS et al., 2015). E dentre essas substâncias, inúmeros extratos têm sido estudados na busca de tratamentos alternativos para estas infecções oportunistas (SANTOS, 2011; ROCHA et al, 2017).

Diversos estudos pesquisam o efeito de extratos como opção de tratamento para a candidose bucal (HOFLING et al, 2010, ALMEIDA et al, 2011, PEREIRA et al, 2016, MADUGULA et al, 2017, SANTOS et al, 2017). Baseado nisso, pesquisadores são impulsionados a investigar novas substâncias antimicrobianas de fontes alternativas, entre elas as oriundas das plantas medicinais (BANSOD; RAI, 2008).

2.2 Utilização popular de plantas medicinais como modalidade terapêutica alternativa

A Fitoterapia constitui uma forma de terapia medicinal de crescimento expressivo nestes últimos anos. No Brasil, as inovações terapêuticas têm sido de baixa ou média intensidade, sendo os fitoterápicos mais vendidos no mercado brasileiro produzidos a partir de espécies estrangeiras (FUNARI; FERRO 2005).

As plantas são possíveis fontes de novos compostos para a descoberta de medicamentos. São utilizadas para fins terapêuticos desde os tempos antigos, e atualmente, desempenham um papel crucial na pesquisa de novas alternativas terapêuticas na prática médica, devido a sua utilidade fitoterápica e como fonte de novas substâncias bioativas com ação antimicrobiana para combater infecções (REIS et al, 2015).

Os fitoquímicos são compostos bioativos naturais amplamente distribuídos em plantas, animais, microrganismos, e outras formas de vida. Os principais exemplos de produtos naturais incluem alcaloides, esteroides, terpenos, polifenóis, flavonoides. Essas substâncias têm usos racionais e são encontrados em quantidades variáveis em diferentes espécies (SHAD et al, 2014).

O uso dos produtos naturais na Odontologia vem sendo um meio terapêutico promissor no campo farmacológico, visto que, apresenta-se como uma alternativa viável e eficaz na prevenção e combate de diversas doenças da cavidade bucal (FREIRES et al, 2010). Assim, a pesquisa em prol do uso de plantas medicinais, com o uso de sua matéria prima pode ser uma alternativa para serem incorporadas às novas formulações terapêuticas para o tratamento de doenças, pois esses produtos têm a capacidade de causar menos efeitos adversos do que os medicamentos sintéticos, apresentando benefício à saúde, aliada a grande

disponibilidade para a aquisição destas pela população e compatibilidade com a cultura regional (ABILIO, 2014; JESUS et al, 2010; NWODO et al, 2011).

É notável que a busca e descoberta por produtos naturais com princípios ativos que apresentem atividade antifúngica e baixo nível de toxicidade tem sido investigada e representam uma evolução farmacológica (SANTOS, 2011; ROCHA et al, 2017).

2.3 Considerações sobre *Syzygium cumini* (L.) Skeel

A espécie *Syzygium cumini* conhecida como Jambolão, pertence à família Myrtaceae, é muito famosa por seus valores nutricionais e medicinais. É muito utilizada na medicina popular principalmente no tratamento de febre, diarreia, asma e diabetes mellitus tipo 2. É uma planta nativa das regiões tropicais, mas também pode ser encontrada em algumas regiões subtropicais. Distribui-se no continente asiático, em países como Índia, Tailândia, Filipinas; continente africano, em países como África do Sul, Madagascar e outros do leste do continente. E também pode ser encontrada na América do Sul e no Brasil, sendo uma planta naturalizada, onde encontra-se distribuída nas regiões Sudeste, Nordeste e Norte, sendo conhecida por denominações populares diversas, tais como jambolão, azeitona, azeitona-roxa, oliva (MIGLIATO et al, 2007; AYYNAMAR; BALIGA et al, 2013; SRIVASTAVA; CHANDRA, 2013).

O emprego frequente desta planta na medicina popular e a existência de relatos sobre as suas potenciais atividades farmacológicas estimularam a realização de pesquisas científicas, as quais identificaram a presença de uma variabilidade de compostos bioativos como compostos fenólicos, flavonoides, taninos, terpenoides, saponinas, alcaloides, glicosídeos, esteroides encontrados em diferentes partes da planta (MIGLIATO et al, 2006; GOWRI; VASANTHA, 2010; BALIGA et al, 2011; CHAGAS et al, 2015; PEREIRA et al, 2016), sugerindo a presença de indicações terapêuticas devido às variadas ações farmacológicas do jambolão (MIGLIATO et al, 2006).

De acordo com Cartaxo-furtado (2015), o composto fitoquímico que apresentou maior concentração no extrato etanólico de casca de *S. cumini* foram taninos, seguido de polifenóis e flavonoides. Assegurando que os extratos desta planta apresentem várias atividades, incluindo citotóxica, antiinflamatória, anti-

cancro, atividades antidiabéticas, diurético e anti-hipertensivo (VEBER et al, 2015; SHAD et al, 2014; SHWETA et al, 2012).

É de grande importância a busca de mais pesquisas e a bioprospecção dessa planta para garantir sua atividade antifúngica que venha a corroborar com os estudos preliminares e a utilização popular do *S. cumini*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento do Estudo

Foi realizado um estudo laboratorial experimental *in vitro*.

3.2 Local da Pesquisa

Os testes de avaliação atividade antifúngica foram realizados no Laboratório de Análise e Diagnóstico do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba/UEPB, Campina Grande-PB. A produção do extrato foi realizada no Laboratório de Desenvolvimento de Medicamentos (LABDEM), da UEPB.

A liofilização do extrato bruto foi realizada no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB.

3.3 Processamento do Material Vegetal

A espécie vegetal, folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeel, foi coletada no mês abril de 2015 na região do semiárido paraibano, Chácara Flor do Campo, zona rural do município de Campina Grande, estado da Paraíba, nordeste do Brasil, mesorregião da Borborema e micro região do Cariri Oriental. O exemplar *Syzygium cumini* (L.) Skeels foi depositado na Coleção do Herbário Professor Lauro Pires Xavier do Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa/PB, identificado com o número de Voucher: JPB 58.543.

O material vegetal foi acondicionado em sacolas de papel e no dia seguinte processado. Realizou-se limpeza deste material, eliminando as partes das folhas impregnadas por líquens ou matéria contaminante que pudessem interferir no padrão de qualidade da planta estudada.

As folhas foram submetidas à lavagem, e em seguida secagem em estufa de ar circulante (FANEM – Modelo 330/5) a 40°C, até a estabilização final do peso. Posteriormente foram moídas em moinho de facas (SOLAB – Modelo SL 30), com diâmetro da partícula de 10 mesh, com finalidade de aumentar a superfície de contato e facilitar a extração dos fitoconstituintes das partes da planta, quando submetidas à solução extratora.

3.4 Produção do Extrato

Foi produzido extrato hidroalcoólico das folhas de *Syzygium cumini* na proporção 200g planta moída para 1 L de solução hidroalcoólica, na concentração de 70%. O método de extração utilizado para obtenção do extrato foi a percolação.

3.5 Microrganismos Envolvidos e Preparo do Inóculo

Foram utilizadas cepas *American Type Culture Collection* (ATCC) provenientes da Fundação Oswaldo Cruz, sendo estas, *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Candida glabrata* (ATCC 90030).

O preparo do inóculo para os testes de suscetibilidade foi realizado seguindo as recomendações do protocolo M27-A3 para leveduras (CLSI, 2008). O inóculo fúngico foi padronizado em espectrofotômetro com comprimento de onda de 530nm e absorvância entre 0,08–0,1, correspondendo à concentração de 5×10^6 UFC/mL. Após diluições sucessivas, obteve-se o inóculo na concentração de 5×10^3 UFC/mL. Nos poços da microplaca, durante a realização dos testes de atividade antimicrobiana, esta concentração reduziu pela metade, resultando em $2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

3.6 Reativação dos Microrganismos

As cepas de referência de *Candida albicans* (ATCC 10231) e *C. glabrata* (ATCC 90030) foram reativadas a partir de sua cultura original em meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA) e, incubadas a 37 °C, por 24 h, em atmosfera de aerobiose. Após esse período, três a cinco colônias foram coletadas e suspensas em 10 mL de caldo Agar Sabouraud (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Após incubação a 37° C, por 24 h, o conjunto foi centrifugado, e as células suspensas em 10 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9%). Em seguida, a concentração de células foi determinada com auxílio de espectrofotômetro, utilizando-se o comprimento de onda de 530 nm. A densidade celular foi estabelecida na absorvância de 0.08- 0.1, equivalente a concentração de 5×10^6 células/mL.

3.7 Determinação da Atividade Antifúngica

A atividade antifúngica do extrato hidroalcoólico de *S. cumini* (L.) Skeels foi determinada segundo a normatização M27-A3 do *Clinical Laboratory and Standards Institute* (CLSI), com algumas modificações, por meio da técnica da microdiluição em caldo (CLSI, 2008). A partir desta, foram obtidos os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) desse produto natural frente *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Candida glabrata* (ATCC 90030).

Microplacas com 96 poços foram preparadas inserindo-se 100 µL de caldo Agar Sabouraud em todos os poços. Em seguida, 100 µL das diluições do extrato de *S. cumini* (L.) Skeel (4000 µg/mL) foram inseridos na primeira fileira de poços da microplaca. Diluições seriadas (1:2) foram então realizadas por meio da transferência de 100 µL aos poços subsequentes. Em seguida, 100 µL da suspensão dos microrganismos (diluído em Caldo Sabouraud Dextrose na concentração de 1×10^3 UFC/mL) foram inseridos em todos os poços. Desse modo, o extrato foi ensaiado em um intervalo de concentrações de 1000 µg/mL a 7,8 µg/mL.

O controle de viabilidade dos microrganismos (ausência de antimicrobiano), bem como controle de esterilidade do meio de cultura (ausência de inoculação de microrganismos nos poços) foram realizados para garantir acurácia do método. Foram utilizados controles farmacológicos com agentes antifúngicos como nistatina e fluconazol sendo esses realizados em concentrações que variaram de 64 µg/mL a 0,5 µg/mL.

As microplacas foram então incubadas a 37° C, por 24 h, em aerobiose. Após esse período, a CIM foi definida como a menor concentração das substâncias capaz de inibir o crescimento visível dos microrganismos avaliados. A viabilidade dos microrganismos foi determinada pela utilização do corante resazurina (3 mM), o qual foi pipetado (50 µL) em todos os poços após o período de incubação para determinação da CIM. A metabolização do corante pelos microrganismos viáveis resultou na produção de um pigmento de cor rosa. Assim, os valores da CIM foram considerados como a menor concentração do extrato que resultou na inibição do crescimento microbiano.

A Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi determinada pela semeadura (10 µL), em triplicata, em placas de Petri contendo o meio de cultura Agar Sabouraud

Dextrose, de todos os poços correspondentes a concentrações iguais ou superiores a CIM. Após semeadura, as placas foram incubadas a 37° C por 24 h. Após esse período, a CFM foi considerada a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento dos sub-cultivos.

3.8 Determinação do efeito do extrato sobre a cinética do crescimento de *Candida albicans*

O efeito do extrato das folhas de *S. cumini* sobre a cinética do crescimento de *Candida albicans* (ATCC 10231) foi determinado pela curva de time-kill, segundo metodologia proposta por Cantón et al (2009), Klepser et al (1997) e De Castro et al (2013), com algumas modificações.

O preparo do inóculo foi realizado seguindo as recomendações do protocolo M27-A3 para leveduras (CLSI, 2008), conforme descrito previamente. Após a obtenção do inóculo, e diluições sucessivas, obteve-se suspensões dos microrganismos equivalentes a 5×10^3 UFC/mL.

Microplacas com 96 poços de fundo chato (Cralpast, Cotia, Brasil) foram preparadas, inserindo-se 100 µL de meio de cultura caldo Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA) em todos os poços. Em seguida, foram inseridos na primeira fileira de poços da microplaca, 100 µL do extrato das folhas de *S. cumini* (4000 µg/mL), assim como para o controle farmacológico, a Nistatina (256 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Controle de viabilidade dos microrganismos (ausência de antimicrobiano), bem como controle de esterilidade do meio de cultura (ausência de inoculação de microrganismos) e controle do veículo (diluyente do extrato) foram também realizados e avaliados para garantir acurácia do método.

Após a adição das substâncias, foram realizadas diluições seriadas (1:2) por meio da transferência de 100 µL de alíquotas da primeira fila de poços aos poços subsequentes. Em seguida, 100 µL da suspensão dos microrganismos diluído em caldo Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA) foram inseridos em todos os poços, obtendo uma concentração final de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. Em seguida, as microplacas foram incubadas a 37°C, por 24 h, em aerobiose (CLSI, 2008).

Para esse teste, as concentrações avaliadas para o extrato e para o controle farmacológico (Nistatina) corresponderam aquelas equivalentes à CIM, sendo esses

valores, equivalentes respectivamente a 125µg/mL para o extrato e 4µg/mL para a nistatina.

Realizou-se a semeadura de alíquotas de 10 µL em placas de Petri preparadas com Ágar Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA) nos intervalos de tempo de 0 (momento inicial), e 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 e 24 horas após o início do ensaio. Após a coleta, as microplacas e placas de Petri foram incubadas em estufa a 37° C por um período de 24h. Decorrido esse período, o número de microrganismos viáveis (UFC/mL) foi avaliado para a concentração em cada tempo de análise. Desse modo, por meio deste teste, pôde-se determinar o efeito das substâncias analisadas, segundo a sua concentração e o tempo de ação exercido sobre *Candida albicans* (ATCC 10231). Os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados foram expressos através da média das triplicatas.

3.9 Análise Estatística

Os resultados do ensaio do efeito do extrato sobre a cinética do crescimento de *Candida albicans* foram analisados através do programa SPSS *Statistics* para Windows® versão 20.0, considerando-se o nível de significância de 5%. A comparação entre os produtos testados foram realizados dentro de cada tempo utilizando-se o teste de análise de variância a um fator fixo (ANOVA one-way) e pós-teste de Tukey.

4 RESULTADOS

Os valores da CIM e CFM (expressos em $\mu\text{g/mL}$) do extrato e dos fármacos sobre as cepas de *Candida* testadas estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Atividade antifúngica do extrato das folhas de *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels e de fármacos padrão sobre fungos do gênero *Candida* (valores de CIM e CFM expressos em $\mu\text{g/mL}$).

MICROORGANISMOS/SUBSTÂNCIAS	CIM	CFM	CFM/CIM
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)			
Extrato <i>S. cumini</i>	125	1000	8
Nistatina	4	64	16
Fluconazol	32	>64	>2
<i>C. glabrata</i> (ATCC 90030)			
Extrato <i>S. cumini</i>	62,5	>1000	>16
Nistatina	2	64	32
Fluconazol	>64	>64	>1
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231) + <i>C. glabrata</i> (ATCC 90030)			
Extrato <i>S. cumini</i>	125	1000	8
Nistatina	4	32	8
Fluconazol	>64	>64	>1

Diante dos dados, percebe-se que o extrato das folhas de *S. Cumini* apresenta efeitos antifúngicos sobre as cepas de *Candida* testadas demonstrando valores de CIM entre $62,5\mu\text{g/mL}$ a $125\mu\text{g/mL}$ para esses microrganismos.

A análise sobre o efeito antifúngico do extrato de *S. cumini* e da Nistatina sobre o crescimento de células planctônicas de *C. albicans* (ATCC 10231) foi avaliado sob diferentes concentrações e tempos de ação das substâncias, visando a investigação dos seus efeitos sobre a cinética do crescimento desse microrganismo. Os resultados estão apresentados na figura 1.

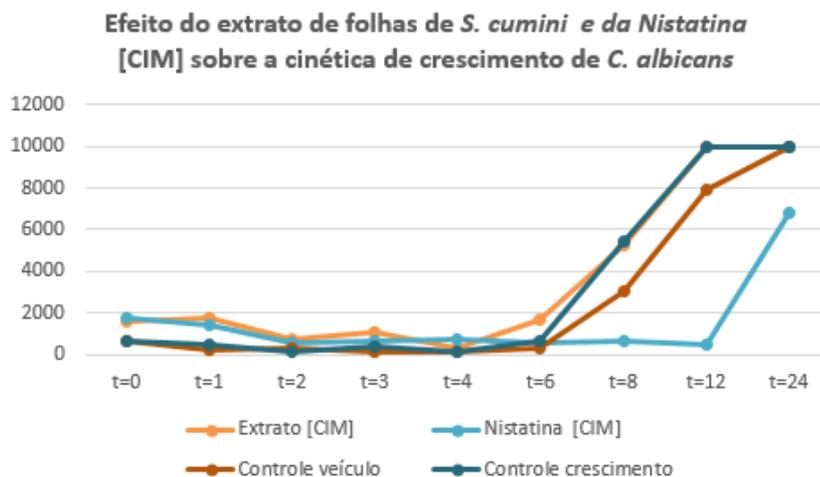


Figura 1. Efeito do extrato das folhas de *Syzygium cumini* e Nistatina sobre a cinética de crescimento de *Candida albicans* (ATCC 10231). Resultados expressos através da média do número de microrganismos (em UFC/mL) segundo os diferentes tempos de ação sob exposição ao extrato e a Nistatina.

De modo geral, comparando a concentração testada e o grupo controle nos diferentes períodos de tempo avaliados (figura 1), a exposição dos microrganismos à concentração do extrato equivalentes a CIM (125µg/mL) demonstrou menores valores de média de número de UFC/mL no período de quatro horas de exposição.

Diferença significativa foi observada apenas no intervalo de tempo equivalente a oito horas de exposição de *C. albicans* à concentração de 125 µg/mL do extrato de *S. cumini*, sendo esta diferença verificada apenas em comparação aquela obtida para a concentração de 4 µg/mL da Nistatina.

Por outro lado, nos períodos de exposição de 12 e 24 horas, o extrato de *S. cumini* não demonstrou efeitos sobre a inibição do crescimento fúngico, visto que nesses períodos de tempo os microrganismos apresentaram crescimento máximo verificado. Entretanto, a Nistatina foi capaz de provocar uma redução do número de microrganismos, apresentando, entretanto, discreto aumento quantitativo no crescimento dos mesmos, quando testada na concentração equivalente a CIM.

5 DISCUSSÃO

As pesquisas relacionadas ao uso de plantas medicinais, principalmente as com atividade antimicrobiana, é relevante pelo custo-benefício aliada a grande disponibilidade para a aquisição destas pela população e compatibilidade com a cultura regional. As plantas são compostas por princípios ativos que são eficazes no tratamento de doenças crônicas, bem como de doenças infecciosas (ABILIO, 2014; SANTOS, 2011).

Nesse estudo, foi observado que o extrato hidroalcoólico das folhas de *S. cumini* apresenta grande potencial de inibição sobre o crescimento de espécies do gênero *Candida*, apresentando uma CIM de 62,5µg/mL frente à espécie *C. glabrata*. Foi possível observar uma maior resistência à ação do extrato frente a espécie de *C. albicans* com uma CIM de 125µg/mL, revelando assim uma atividade antifúngica forte, de acordo com a classificação de Aligiannis et al (2001) que considera forte valores de CIM até a concentração de 500µg/mL. Entretanto, de acordo com a classificação de Holetz et al (2002), em que os mesmos classificam em atividade boa (CIM até 100 µg/mL), moderada (CIM entre 100 e 500 µg/mL), fraca (de 500 a 1000 µg/mL) e inativo quando a CIM for maior que 1000 µg/mL, o extrato de *S. cumini* demonstra atividade que varia de moderada a boa sobre o crescimento das espécies analisadas. 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 ulceracões, afecções da orofaringe e outras doenças da cavidade bucal (COSTA et al, 2009).

Ao relacionar a CIM com a CFM através da razão CFM/CIM, observou-se que a razão entre essas concentrações, em todas as cepas testadas, apresentou valores ≥ 4 , determinando assim sua atividade fungistática (SIDDIQUI et al, 2013).

A atividade anti-*Candida* do extrato também foi observada através da Cinética de Crescimento (*Curva Time-Kill*) sobre *Candida albicans*, este teste tem por objetivo analisar a interação do produto-teste com o microrganismo, a fim de caracterizar uma relação dinâmica entre concentração e atividade ao longo do tempo (KLEPSEK et al, 1997), em nove períodos de tempos distintos, observou-se a ação do extrato de *S. cumini* e da Nistatina, substância utilizada como controle positivo neste estudo.

Pôde-se observar, no presente estudo que o extrato apresenta uma atividade anti-*Candida* dependente da concentração, visto que na concentração equivalente a CIM de 125 µg/mL demonstrou os menores valores de média de UFC/mL. Ao comparar as substâncias analisadas, apenas a Nistatina mostrou diferença estatisticamente significativa com relação as demais, diminuindo consideravelmente o número de microrganismos viáveis em períodos de tempos iguais ou superiores a 8 horas.

Pouco é descrito na literatura sobre a atividade antifúngica de *S. cumini*, contudo os resultados dessa 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 200µg/mL, mostrando um pouco superior ao apresentado nesta pesquisa, indicando atividade antifúngica em ambos os estudos.

Do mesmo modo os resultados encontrados corroboram com o estudo de Cartaxo-furtado (2015) no qual frente *C. albicans*, o jambolão apresentou-se como um forte inibidor de crescimento, pois o valor da CIM foi igual a 250 µg/mL.

Adicionalmente, a investigação do efeito biológico do extrato de folhas de *S. cumini* sob diferentes concentrações e intervalos de tempo teve sua importância ressaltada sobretudo em virtude de permitir elucidar as melhores condições nas quais o mesmo exerceu seu efeito antimicrobiano (KLEPSEK et al, 1997; CANTÓN et al, 2009; DE CASTRO et al, 2013), determinando, portanto, os melhores perfis para os quais sua utilização poderia ser indicada.

Os resultados obtidos demonstram ser de grande importância a realização de pesquisas *in vivo*, além de testes de toxicidade para que desta forma, futuramente, o extrato de folhas de *S. cumini* possa ser utilizado, clinicamente, no tratamento da candidose oral visto que, o extrato possui metabólitos secundários com potencial de ação sobre a inibição do crescimento de *Candida* spp. Portanto, este estudo sugere que mais pesquisas sejam realizadas dando continuidade à bioprospecção, por meio de análises experimentais com essa espécie vegetal.

6 CONCLUSÃO

- O extrato das folhas de *Syzygium cumini* apresentou potencial antimicrobiano sobre todas as cepas de *Candida* testadas, com efeito considerado de forte a moderado, visto os resultados evidenciados pela resposta fúngica.
- O extrato de *S. cumini* apresenta atividade antifúngica com ação fungistática sobre todas as cepas de *Candida* avaliadas, sendo esse efeito mais significativo quando a *C. albicans* foi exposta a sua ação por um período de oito horas.
- Mediante os resultados obtidos da atividade antifúngica do extrato de *Syzygium cumini*, sugere-se mais investigações utilizando essa planta na perspectiva do desenvolvimento de produtos com finalidade terapêutica alternativa e complementar de uso odontológico.

REFERÊNCIAS

- ABILIO, V.M.F. et al. Atividade antifúngica de produtos naturais indicados por raizeiros para tratamento de candidíase oral. **Rev Cubana Estomatol**, Ciudad de La Habana, v.51, n.3, p. 259-269, set. 2014.
- ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 4168-4170, 2001.
- ALMEIDA, L.F.D. et al. Screening of Antifungal Activity of Essential Oils on *Candida Albicans*. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 51-56, 2011.
- AYYANAMAR, M.; SUBASH-BABU, P. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses **Asian Pac J Trop Biomed**, v. 2, n. 3, p. 240-246, 2012.
- BALIGA, M.S. et al. Scientific validation of the antidiabetic effects of *Syzygium jambolanum* DC (Black Plum), a traditional medicinal plant of India. **J Altern Complement Med**, v. 19, n. 3, p. 191–197, 2013.
- BANSOD, S.; RAI, M. Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. **World Journal of Medical Sciences**, v.3, n.2, p.81-88, 2008.
- CANTÓN, E. et al. *In vitro* activities of echinocandins against *Candida krusei* determined by three methods: MIC and minimal fungicidal concentration measurements and time-kill studies. **Antimicrob Agents Chemotherapy**, v. 53, n.7, p.3108–3111, 2009.
- CARTAXO-FURTADO, N.A.D.E.O. et al. 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.
- CHAGAS, V.T. et al. *Syzygium cumini* (L.) skeels: a prominent source of bioactive molecules against cardiometabolic diseases. **Front Pharmacol**, v. 6, n. 259, p. 1-8, 2015.
- CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESALU, V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, India, v. 91, p. 105–108, mar. 2004.
- CLSI. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Norma M27-A3 NCCLS. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras**. Pensilvânia: NCCLS; 2008. 59p.
- COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 599-607, 2003.

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.

COUTINHO, H.D.M. Factors Influencing the Virulence of *Candida* Spp. **The West Indian Medical Journal**, v. 58, n. 1, p. 160-163, 2009.

DE CASTRO, R.D. et al. Combined effect of *Cinnamomum zeylanicum* blume essential oil and nystatin on *Candida albicans* growth and micromorphology. **Rev Ciênc Méd Biol**, v. 12, n. 2, p.149-156, 2013.

FARIA, A. F.; MARQUES, M. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification of bioactive compounds from jabolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1571-1578, 2011. ISSN 0308-8146.

FREIRES, I.A. et al. Atividades antibacteriana e antiaderente in vitro de tinturas de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) e *Solidago microglossa* (Arnica) frente a bactérias formadoras do biofilme Dentário. **Odontol. Clín.-Cient.**, v. 9, n. 2, p. 139-143, 2010.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.1, p.178-182, 2005.

GIACOMAZZI, J. et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v. 59, p. 145-150, 2016.

GOWRI, S.S.; VASANTHA, K. Phytochemical screening and antibacterial activity of *Syzygium cumini* (L.) (Myrtaceae) leaves extracts. **International Journal of Pharm Tech Research**, v. 2, n. 2, p. 1569-1573, 2010.

HOFLING, JF. et al . Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. **Braz. J. Biol.**, São Carlos , v. 70, n. 4, p. 1065-1068, Nov. 2010 .

HOLETZ, F.B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.97, n.7, p.1027-1031,2002.

JESUS, R. P. F. S. de, et al., Ação antibacteriana e antiaderente de *Pithecellobium cochliocarpum* (Gomez) Macbr sobre microrganismos orais. **Odontologia Clínico-Científica (Online)**,v.9, n.4, p.331-335, 2010.

KIM, J.Y. Human fungal pathogens: Why should we learn? **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 145–148, 2016.

KLEPSEK, M.E. et al. Antifungal Pharmacodynamic Characteristics of Fluconazole and Amphotericin B Tested against *Candida albicans*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 41, n. 6, p. 1392-1395, 1997.

LOGUÉRCIO, A. P. et al. Atividade antibacteriana de extrato hidroalcoólico de folhas de jabolão (*Syzygium cumini* L. Skells, **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 371-376, 2005.

LOPES, A.C. Tratado de clínica médica. São Paulo: Roca, v.3, n.1, p.5366, 2006.

MADUGULA, P. et al. "Rhetoric to Reality"- Efficacy of *Punica Granatum* Peel Extract on Oral Candidiasis: An *In vitro* Study. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 11, n. 1, p. 114-117, 2017.

MIGLIATO, K. F. et al. Quality control of *Syzygium cumini* (L.) Skeels fruits. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 94-101, 2007. ISSN 0102-695X.

MUADCHEINGKA, T.; TANTIVITAYAKUL, P. Distribution of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species in oral candidiasis patients: Correlation between cell surface hydrophobicity and biofilm forming activities. **Archives of Oral Biology**, v. 60, p. 894-901, 2015.

NWODO, U. U. et al., Assessment of *Tamarindus indica* extracts for antibacterial activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 6385-6396, 2011.

OLIVEIRA, G. F. et al. A. Antimicrobial activity of *Syzygium cumini* (Myrtaceae) leaves extract. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 2, jun. 2007.

PEREIRA, J.V. et al. Antifungal potential of *Sideroxylon obtusifolium* and *Syzygium cumini* and their mode of action against *Candida albicans*. **Journal of Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 10, p. 2312–2319, 2016.

REIS, L.F.C. et al. Chemical characterization and evaluation of antibacterial, antifungal, antimycobacterial, and cytotoxic activities of *Talinum paniculatum*. **Rev Inst Med trop**, São Paulo, v. 57, n. 5, p. 397-405, 2015.

ROCHA, E.A.L.S.S. et al. Antifungal Activity, Phytochemical Characterization and Thermal Profile of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 17, n. 1, 2017.

SANTOS, K.K.A. Atividade antiepimastigota, citotóxica e fungicida de plantas medicinais da Região do Cariri. 2011. Dissertação (Mestrado). Universidade Regional do Cariri, Ceará, 2011.

SANTOS, M.G.C. et al. *Punica granatum* Linn. prevention of oral candidiasis in patients undergoing anticancer treatment. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 46, n. 1, p. 33-38, 2017.

SHAD, A.A. et al. Phytochemical and Biological Activities of Four Wild Medicinal Plants. **Scientific World Journal**. p. 1-7, 2014.

SHWETA, S. et al. A review on pharmacological activity of *Syzygium cumini* extracts using different solvents and their effective uses. **International Research Journal of Pharmacy**. v. 3, n. 1, p. 54–58, 2012.

SIDDIQUI, Z.N. et al. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v.17, n.2, p.237–243,2013.

SOUZA JÚNIOR, U.P. et al. *In vitro* antifungic activity of *Uncaria Tomentosa* L. (Cat's Claw) against *Candida*. **Pesquisa Brasileira Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 11, n. 4, p. 477-480, 2011.

SRIVASTAVA, D.; CHANDRA, S. Pharmacological potentials of *Syzygium cumini*: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8ª edição, Porto Alegre: Artmed, p.894, 2005.

VEBER, J. et al. Determinação dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante de extratos aquosos e etanólicos de Jambolão (*Syzygium cumini* L.). **Rev bras plantas med**, Botucatu , v. 17, n. 2, p. 267-273, 2015.

VIZZOTTO, M.; FETTER, R. Jambolão: o poderoso antioxidante. 2009. Disponível em: <http://www.cpact.embrapa.br/imprensa/artigos/2009/jambolao_Marcia.pdf>. Acesso em 23 de maio de 2019.