



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CAMPUS VIII – PROFESSORA MARIA DA PENHA – ARARUNA  
CENTRO DE CIÊNCIAS, TECNOLOGIA E SAÚDE  
CURSO DE ODONTOLOGIA**

**DAIANE BEZERRA NOGUEIRA DA SILVA**

**EFEITO *IN VITRO* DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *SCHINOPSIS BRASILIENSIS*  
ENGL. SOBRE ISOLADOS CLÍNICOS DE *CANDIDA SPP.* ENVOLVIDOS EM  
INFECÇÕES ORAIS**

**Araruna / PB**

**2017**

**DAIANE BEZERRA NOGUEIRA DA SILVA**

**EFEITO *IN VITRO* DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *SCHINOPSIS BRASILIENSIS*  
ENGL. SOBRE ISOLADOS CLÍNICOS DE *CANDIDA* SPP. ENVOLVIDOS EM  
INFECÇÕES ORAIS**

Artigo apresentado à Coordenação do  
Curso de Odontologia da UEPB – Campus  
VIII como requisito parcial para a obtenção  
do título de Cirurgiã-Dentista.

Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Me. Marianne de Lucena  
Rangel

**Araruna / PB**

**2017**

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.

S586e Silva, Daiane Bezerra Nogueira da.  
EFEITO IN VITRO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE  
SCHINOPSIS BRASILIENSIS ENGL SOBRE ISOLADOS  
CLÍNICOS DE CANDIDA SPP. ENVOLVIDOS EM  
INFECÇÕES ORAIS [manuscrito] : / Daiane Bezerra Nogueira  
da Silva. - 2017.  
31 p.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em  
Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de  
Ciências, Tecnologia e Saúde, 2017.

"Orientação : Profa. Ma. Marianne de Lucena Rangel,  
Coordenação do Curso de Odontologia - CCTS."

1. Candida. 2. Antifúngicos. 3. Plantas Medicinais.

21. ed. CDD 617.6

DAIANE BEZERRA NOGUEIRA DA SILVA

EFEITO *IN VITRO* DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *SCHINOPSIS BRASILIENSIS* ENGL.  
SOBRE ISOLADOS CLÍNICOS DE *CANDIDA* SPP. ENVOLVIDOS EM INFECÇÕES  
ORAIS

Artigo apresentado à Coordenação do  
Curso de Odontologia da UEPB –  
Campus VIII como requisito parcial para a  
obtenção do título de Cirurgiã-Dentista.

Área de concentração: Microbiologia.

Aprovada em: 14/12/2017.

BANCA EXAMINADORA

Marianne de Lucena Rangel

Prof. Me. Marianne de Lucena Rangel (Orientadora)

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Gêisa Aiane de Moraes Sampaio

Prof. Me. Gêisa Aiane de Moraes Sampaio

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Larissa Rangel Peixoto

Prof. Me. Larissa Rangel Peixoto

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais David e Marinalva,  
meus grandes exemplos de pessoas do bem,  
fontes de inspiração para todo o meu aprendizado.  
Minhas vitórias serão sempre dedicadas a vocês!*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado o dom da vida, a força, a perseverança, o discernimento e a sabedoria, proporcionando a realização deste sonho, sem ele nada seria possível.

Aos meus pais David e Marinalva, por me amarem incondicionalmente, pelas lições de vida e por terem me dado à oportunidade de hoje ser quem eu sou. Por terem acreditado em mim e me ensinado a sonhar com humildade e sensibilidade.

Aos meus irmãos David, Flávio e Fernanda pela cumplicidade, paciência e amor nas horas mais difíceis.

Ao meu noivo Josivaldo, pelo incentivo e amor constante nos momentos mais difíceis e por compartilhar das minhas lágrimas e sorrisos.

A Izabel Cristina, Viviane Gonçalves, Nayla Fernandes e Malena Suênia, minhas amigas e companheiras de curso, pela amizade, cumplicidade e companheirismo durante todos esses anos.

À Prof.<sup>a</sup> Marianne de Lucena Rangel pela orientação, convívio agradável, por todo o apoio, ensino e disposição na construção desse trabalho, por ser uma inspiração de comprometimento, seriedade e dedicação ao trabalho.

Não poderia deixar de expressar meus agradecimentos a Ana Cláudia, mestranda da UFPB, por todo conhecimento transmitido, paciência e interesse.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste sonho.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>Tabela 1</b>	Valores de referência para o perfil de sensibilidade fúngica	15
<b>Tabela 2</b>	Halo de inibição (mm) e perfil de suscetibilidade de amostras de <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> isoladas da cavidade bucal aos diferentes antifúngicos.	17
<b>Tabela 3</b>	Atividade antifúngica do extrato das folhas da <i>S. brasiliensis</i> Engl. sobre <i>Candida</i> spp. (valores de CIM e CFM expressos em µg/mL)	18

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SIGLA	DEFINIÇÃO
<b>NUMETROP:</b>	Núcleo de Medicina Tropical
<b>µg:</b>	Micrograma
<b>µg/mL:</b>	Micrograma por mililitro
<b>CIM:</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CFM:</b>	Concentração Fungicida Mínima
<b>CCS:</b>	Centro de Ciências da Saúde
<b>CSD:</b>	Caldo Sabouraud Dextrose
<b>SDA:</b>	Sabouraud Dextrose Agar
<b>UFPB:</b>	Universidade Federal da Paraíba
<b>UFC:</b>	Unidades Formadoras de Colônias
<b>TCT:</b>	Trifenil Cloreto de Tetrazólio
<b>µl:</b>	Microlitro
<b>CLSI:</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute



## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b>	
<b>RESUMO</b>	
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	09
<b>2 METODOLOGIA</b> .....	14
2.1 Produto teste .....	14
2.2 Local de realização da pesquisa .....	14
2.3 Microorganismos .....	14
2.4 Perfil de sensibilidade das cepas fúngicas .....	14
2.5 Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....	15
2.6 Concentração Fungicida Mínima (CFM) .....	16
<b>3 RESULTADOS</b> .....	17
3.1 Análise do perfil de sensibilidade das cepas fúngicas.....	17
3.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM).....	18
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	19
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	22
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	24

**EFEITO *IN VITRO* DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *SCHINOPSIS BRASILIENSIS* ENGL. SOBRE ISOLADOS CLÍNICOS DE *CANDIDA* SPP. ENVOLVIDOS EM INFECÇÕES ORAIS**

***In vitro* effect of *Schinopsis brasiliensis* Engl. leaf extract on *Candida* spp. involved in oral infections**

Daiane Bezerra Nogueira da Silva<sup>1</sup>

**RESUMO**

**Objetivo:** Caracterizar o perfil de susceptibilidade de isolados clínicos *Candida* spp. frente a diferentes antifúngicos e investigar o efeito antifúngico do extrato das folhas da *Schinopsis brasiliensis* Engl. sobre cepas clínicas de *Candida* coletadas da cavidade bucal. **Métodos:** A caracterização do perfil de sensibilidade fúngica das cepas testes *Candida albicans* (n=4) e *Candida tropicalis* (n=4) foi determinada pelo teste de difusão em disco protocolado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Foram determinadas a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do extrato sobre cepas clínicas de *Candida* spp. coletadas da cavidade bucal, pela técnica de microdiluição em meio líquido e da semeadura do subcultivo, respectivamente. **Resultados:** No perfil de sensibilidade, apenas uma cepa de *C. albicans* demonstrou susceptibilidade ao efeito de todos os antifúngicos testados, enquanto todas as outras leveduras se apresentaram resistentes a pelo menos um antifúngico. Foi observado efeito antifúngico do extrato sobre todas as cepas testadas, com CIM e CFM entre 15,6 e 250µg/mL. A razão CFM/CIM revelou a atividade fungicida do extrato para a maioria das espécies analisadas. **Conclusão:** O perfil de sensibilidade das cepas avaliadas demonstrou diferença de susceptibilidade entre os antifúngicos testados, sendo os poliênicos mais eficazes que os azóis. O extrato da folha da *S. brasiliensis* possui atividade antifúngica sobre cepas clínicas do gênero *Candida*, apresentando efeito fungicida para a maioria das leveduras.

**PALAVRAS CHAVES:** *Candida*. Antifúngicos. Plantas Medicinais.

---

\*Aluna de Graduação em Odontologia na Universidade Estadual da Paraíba – Campus VIII.  
Email:dayane\_uepb2012@hotmail.com

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre os sítios do corpo humano, a cavidade bucal é aquela que apresenta a maior diversidade de microrganismos, contendo diversos tipos de bactérias, fungos e, em menor proporção, protozoários, e vírus, que constituem a microbiota oral anfibiótica. Esses microrganismos permanecem em homeostase, como reflexo de um equilíbrio dinâmico entre a microbiota e o hospedeiro. Porém, a ruptura desse equilíbrio biológico, pode ocasionar agressões inflamatórias e infecciosas ao hospedeiro (DONGARI- BAGTZOGLOU et al, 2009, MARSH, 2010, SARDI et al, 2013).

Entre os microrganismos colonizadores da cavidade bucal estão os fungos da espécie *Candida* spp.. A manutenção do estado comensal e não agressor de *Candida* é possível graças à microbiota anfibiótica e à proteção proporcionada pelas barreiras físicas do organismo e pela atividade do sistema imune. Entretanto, alterações locais e/ou sistêmicas que interfiram nesses fatores podem provocar um desequilíbrio favorecendo o desenvolvimento da doença chamada candidose bucal (VASCONCELLOS et al, 2015).

As espécies de *Candida* spp. podem provocar infecções que vão desde doenças mucocutâneas até condições graves com disseminação sistêmica do quadro infeccioso podendo ser fatal em indivíduos imunocomprometidos. Embora a *Candida albicans* seja o principal patógeno implicado no desenvolvimento da candidose bucal, outras espécies, como *C.glabarata*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis* estão cada vez mais presentes (MUZYKA; EPIFANIO, 2013, MENEZES et al, 2013, AIKAWA et al, 2016). Um dos atributos de virulência desse gênero de fungos é o seu polimorfismo permitindo se apresentar sob a forma leveduriforme de blastósporo (comensal) ou sob a forma micelial de hifa ou pseudo-hifa (patogênica). Além disso, possuem alta capacidade de se adaptarem as mudanças ambientais e a habilidade de formarem biofilmes sobre superfícies bióticas e abióticas (SENEVIRATNE et al, 2008, DINIZ et al, 2010, SESMA et al, 2011).

Entre as alterações locais para o surgimento da candidose bucal, estão o uso de aparelhos protéticos e ortodônticos, tabagismo, hipossalivação, mudança de hábitos alimentares e higiene oral deficiente. Entre os fatores sistêmicos

predisponentes estão o uso de medicamentos, imunossupressão, alterações hormonais, radioterapia, quimioterapia, AIDS e outras doenças sistêmicas que reduzem a atividade do sistema imunológico (STRAMANDINOLI et al, 2010).

A candidose bucal pode manifestar-se clinicamente de diferentes formas, podendo ser classificada em candidose pseudomembranosa, eritematosa, hiperplásica e queilite angular. O tipo pseudomembranoso é caracterizado pela presença de placas brancas, facilmente destacáveis, que recobrem áreas eritematosas da mucosa. No tipo eritematoso observa-se clinicamente uma mancha vermelha, normalmente na zona posterior-média do dorso da língua, palato ou na mucosa bucal. As lesões no dorso da língua apresentam áreas despapiladas, normalmente assintomática. A forma hiperplásica apresenta lesões discretas crônicas que variam de pequenas, palpáveis e translúcidas a grandes placas densas e opacas, com áreas duras e ásperas à palpação. A queilite angular aparece sob forma de fissuras eritematosas nas comissuras labiais (SAMARANAYAKE, 2009, HUBER; TERÉZHALMY, 2011).

Como consequência da candidose bucal o paciente pode apresentar disgeusia, desconforto local como a sensação de ardor e disfagia esofágica, que podem levar à deficiência nutricional, recuperação lenta e internação hospitalar prolongada. A candidíase oral pode ainda disseminar para o trato gastrointestinal e levar ao óbito, ocorrendo principalmente em pacientes terminais com doenças debilitantes, neoplásicas, doenças imunossupressoras e após transplantes de órgãos (AKPAN; MORGAN, 2002, GROSSI, 2009).

O diagnóstico da candidose bucal é fundamentado nos sinais presentes ao exame físico e na anamnese, podendo ser associado à cultura microbiológica para confirmar a presença do microrganismo de *Candida*. A abordagem medicamentosa para tratamento da candidose inclui agentes antifúngicos tópicos e sistêmicos. As quatro principais classes de antifúngicos usados, atualmente, no tratamento da candidose são os poliênicos (como nistatina e anfotericina B), os imidazóis (como clotrimazol e miconazol), os triazóis (como o fluconazol e itraconazol) e as equinocandinas (como a caspofungina) (PAIVA et al, 2009).

Do grande grupo de poliênicos, as duas drogas mais usadas clinicamente são anfotericina B e nistatina, que apresentam estruturas químicas similares e o mesmo

mecanismo de ação (RANG;DALE; RITTER, 2007). A anfotericina B, é considerada o antifúngico mais eficaz disponível atualmente. Contudo, seu uso é restrito pela sua toxicidade sistêmica e local, sendo a disfunção renal o efeito tóxico mais importante que ocorre na grande maioria dos pacientes. Com relação a nistatina seu espectro de ação e mecanismo são semelhantes aos da anfotericina B, porém é altamente tóxica quando usada por via sistêmica ou intravítrea (SERRACARBASSA et al, 2003).

Os imidazóis como o Miconazol e Ketoconazol, são menos tóxicos que os antifúngicos poliênicos e eficazes contra várias espécies de fungos. Os triazóis como o Fluconazol apresentam baixa toxicidade, com relatos de náusea e aumento transitório de enzimas hepáticas (COLOMBO et al, 2013, GAVALDÁ et al, 2003). Equinocandinas são lipopeptídeos semi-sintéticos, representam a mais nova classe de antifúngicos e incluem a caspofungina, micafungina e anidulafungina (KAUFFMAN;CARVER, 2008, MOHR et al, 2008, MUÑOZ et al, 2010). Embora a maioria das espécies de *Candida* seja susceptível a essa nova classe de antifúngicos, cepas do complexo *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* já foram descritas apresentando susceptibilidade reduzida a estas drogas, bem como cepas de *C. glabrata* que tem apresentado perfil resistente, podendo indicar o surgimento de resistência às equinocandinas (GEUSAU et al, 2014, MITCHELL et al, 2013).

Apesar das terapias antifúngicas existentes, são relatadas limitações no que se refere à toxicidade sobre as células humanas e a resistência, tanto intrínseca como adquirida, por parte dos fungos (CANUTO et al, 2002, ALVES et al, 2006, NETT et al, 2007, NISHI et al, 2009, SENA et al, 2009, CAVALCANTI et al, 2011, VANDEPUTTE et al, 2012). Diante da resistência às drogas antifúngicas comercialmente utilizadas, do elevado custo do tratamento e do alto índice de infecções hospitalares e taxa de mortalidade, houve um aumento da busca por medicamentos de origem natural, que proporcionassem maior segurança de uso e que fossem mais eficazes (TAVARES et al, 2008).

Plantas medicinais são amplamente utilizadas pela humanidade desde os tempos primórdios. E atualmente, surgem como fonte de novas moléculas com grande potencial antimicrobiano (CARDOSO et al, 2010, MARTINS, 2009, SILVA; RANGEL, 2010). A partir dos anos setenta, a Organização Mundial da Saúde (OMS)

incentivou o estudo científico das plantas medicinais, objetivando o conhecimento dos benefícios desses agentes medicinais e avaliando os riscos quanto a sua toxicidade (MOLINA et al, 2008). Nesse contexto, o Brasil merece destaque por deter a maior diversidade vegetal do mundo, que, aliada ao conhecimento tradicional e a tecnologia capaz de validar cientificamente esse aprendizado, possibilita um grande potencial do país para o desenvolvimento de fitomedicamentos (DANTAS, 2013).

Dentre as plantas que vem sendo exploradas pelas suas atividades biológicas está a *Schinopsis brasiliensis* Engler., popularmente conhecida como Braúna, baraúna, quebracho ou chamacoco. É nativa do Brasil, pertencente à família Anacardiaceae e de ocorrência nos domínios fitogeográficos da Caatinga e do Cerrado, com distribuição no Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil. As árvores adultas podem atingir de 6-15m de altura, possui ramos providos de espinhos rígidos, com uma casca áspera de cor cinza-escura que se desprende em porções irregularmente quadrangulares, com espessura de até 30 mm, folhas aromáticas, flores brancas, pequenas e frutos caracterizados por serem secos, simples e indeiscentes, do tipo sâmara, com adaptações à anemocoria. É uma espécie que não tolera temperaturas amenas e se comporta como decídua facultativa no período de estiagem (DIAS et al, 2007, CARVALHO, 2014, KIILL et al, 2012, CNIP, 2017).

Na medicina popular, as folhas, casca, caule, entrecasca, resina, fruto de *S. brasiliensis* Engl., são indicadas como anti-inflamatório em geral, no tratamento da gripe, febre, tosse, diarreia, disenteria, impotência sexual, fraturas, micoses superficiais, feridas e das verminoses em animais. Utilizada também pelos índios kariri-xocó e xocó, sendo sua casca triturada e cozida usada para aliviar dores de dente, e o chá da casca usado no combate à dor de ouvido (SARAIVA, 2007, CARVALHO, 2009).

Alguns estudos tem avaliado *in vitro* ações farmacológicas desse vegetal e observaram que extratos das folhas possuem ação antioxidante e antimicrobiana (CHAVES et al, 2011, SARAIVA et al, 2011). Ao estudar o potencial antimicrobiano do extrato da casca de braúna, foi verificada a presença de atividade contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, além

de inibir o crescimento de *C. albicans* e *C. parapsilosis* (PEREIRA, 2007, DONATI et al, 2014).

Apesar do potencial antimicrobiano demonstrado em alguns estudos, a atividade antifúngica da *S. brasiliensis* Engl. ainda é pouco explorada. Além disso, as limitações dos antifúngicos convencionais e dos mecanismos de resistência dos microrganismos fúngicos fomentam a necessidade de buscar por novas alternativas terapêuticas para o tratamento da candidose bucal. Dessa forma, esse estudo objetivou caracterizar o perfil de sensibilidade fúngica de cepas de *Candida* spp. coletadas da cavidade bucal frente a diferentes antifúngicos e analisar o efeito antifúngico do extrato das folhas da *S. brasiliensis* Engl. sobre essas cepas.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Produto teste**

As folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. foram coletadas em Campina Grande, Paraíba, Brasil. Uma amostra foi preparada e depositada no herbário Professor Jayme Coelho de Moraes (Código do Herbário: EAN), Universidade Federal da Paraíba, sob o número EAN-14049. O material vegetal foi seco num forno de ar circulante a  $40 \pm 1$  ° C e triturado com um tamanho de partícula de 10 mesh. As partículas de planta em pó (100 g) foram extraídas exaustivamente com 96% etanol por percolação, e posteriormente a concentração foi conduzida em um evaporador rotativo (CHAVES et al, 2015).

### **2.2 Local de realização da pesquisa**

Os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Farmacologia Experimental e Cultivo Celular da Universidade Federal da Paraíba.

### **2.3 Microrganismos**

Foram utilizadas cepas clínicas coletadas da cavidade bucal que foram isoladas, identificadas e cedidas pelo Laboratório de Micologia Clínica do CCS/UFPB, sendo: *C. albicans* LM01, *C. albicans* LM02, *C. albicans* LM03, *C. albicans* LM04, *C. tropicalis* LM05, *C. tropicalis* LM06, *C. tropicalis* LM07 e *C. tropicalis* LM08.

### **2.4 Perfil de sensibilidade das cepas fúngicas**

Foi utilizado o teste de difusão em disco protocolado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009). As suspensões das leveduras foram preparadas em meio Caldo Sabouraud Dextrose (CSD) e ajustadas com turbidez equivalente a  $5 \times 10^5$  UFC/mL, 530 nm, abs 0,08-0,1. Com um swab estéril as suspensões foram espalhadas na superfície do Sabouraud Dextrose Agar (SDA) contido em placas de petri. Os discos com os antifúngicos Fluconazol (25 µg), Miconazol (50 µg), Anfotericina B (100 µg), Ketoconazol (50 µg) e Nistatina (100 UI)



(Cecon, São Paulo, SP, Brasil) foram aplicados na superfície do ágar. As placas foram incubadas a 35 ° C e após 24 horas mediu-se o halo de inibição de crescimento. A sensibilidade das leveduras diante dos antifúngicos testados foi interpretada segundo os valores de referência adotados pela (CLSI), apresentados na Tabela 01.

**Tabela 01. Valores de referência para o perfil de sensibilidade fúngica**

Perfil	Zona de inibição (mm)				
	Anfotericina B	Nistatina	Miconazol	Ketoconazol	Fluconazol
Sensível	>10	>10	>20	>20	◀19
Intermediário	↑10	-	20-10	20-10	18-15
Resistente	↑10	↑1	<10	<10	↑14

0

## 2.5 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi realizada pela técnica de microdiluição em placa de 96 poços (STANDARDS, 2002). Para tanto, cada poço recebeu 100 µL de meio Caldo Sabouraud Dextrose (CSD) (KASVI<sup>®</sup>, Kasv Imp e Dist de Prod p/ Laboratorios LTDA, Curitiba, Brasil). O extrato das folhas da *S. brasiliensis* Engl. foi transferido (100 µL) para os primeiros poços da placa e realizou-se a diluição seriada para os poços subsequentes com as concentrações variando de 2000 a 15,62µg/mL. Os inóculos das cepas fúngicas foram preparados e ajustados em espectrofotômetro na concentração de  $5,0 \times 10^6$  UFC/mL (absorbância de 0,08 a 0,10 a 530nm), e, em seguida, diluídos para obter uma concentração final de  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL após a inserção de 100 µL em cada poço. A nistatina (Sigma-Aldrich, São Paulo – SP, Brasil) foi utilizada como controle positivo com concentrações variando de 12 a 0,09 µg/mL. Foram realizados o controle de viabilidade das cepas e o controle de esterilidade do meio de cultura. As placas foram incubadas em estufa por 24h a 37°C e, em seguida, a leitura visual foi realizada (STANDARDS, 2002). Para confirmação da presença de microrganismos viáveis foram inseridos 50 µL do corante 2,3,5-Trifenil Cloreto de Tetrazólio (TCT) em cada poço da placa e a mesma incubada novamente em estufa por 24h. O TCT reflete a atividade das enzimas desidrogenases envolvidas no processo de respiração celular, evidenciando com

coloração vermelha a formação de aglomerados de células viáveis no fundo dos poços da placa (DESWAL;CHAND, 1997). O ensaio foi realizado em triplicata para cada cepa teste e repetido três vezes, em momentos distintos, com os mesmos critérios acima descritos.

## **2.6 Concentração Fungicida Mínima (CFM)**

A partir dos resultados obtidos no ensaio para determinação da CIM, foram semeados 50  $\mu$ L dos poços referentes à CIM e as duas concentrações imediatamente maiores (CIM x 2 e CIM x 4) em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) (KASVI<sup>®</sup>, Kasv Imp e Dist de Prod p/ Laboratorios LTDA, Curitiba, Brasil). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 48h. A leitura visual foi realizada observando-se o crescimento fúngico no meio sólido. O teste foi realizado em triplicata e a CFM foi considerada a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível do subcultivo. Para determinar se a atividade do extrato foi fungicida ou fungistática realizou-se a razão entre CFM e CIM, classificando-se como fungistática quando  $CFM/CIM \geq 4$  e fungicida quando  $CFM/CIM < 4$  (SIDDIQUI et al, 2013).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Análise do perfil de sensibilidade das cepas fúngicas

A Tabela 02 apresenta o perfil de sensibilidade das cepas frente a diferentes antifúngicos. A cepa de *C. albicans* LM01 foi a única que demonstrou susceptibilidade ao efeito de todos os antifúngicos testados, enquanto todas as outras leveduras se apresentaram resistentes a pelo menos um antifúngico. A cepa mais resistente foi a *C. albicans* LM03, sendo sensível apenas à Anfotericina B. Entre os antifúngicos testados, o Fluconazol possuiu menor potencial de ação, com atividade apenas sobre um microrganismo dentre os oito testados. O potencial antifúngico de maior espectro foi apresentado pela Anfotericina B e Nistatina.

**Tabela 02. Halo de inibição (mm) e perfil de suscetibilidade de amostras de *C. albicans* e *C. tropicalis* isoladas da cavidade bucal frente aos diferentes antifúngicos.**

Cepa	Anfotericina B	Nistatina	Miconazol	Ketoconazol	Fluconazol
<i>C. albicans</i> LM01	17 (S)	20(S)	24(S)	29(S)	20(S)
<i>C. albicans</i> LM02	16 (S)	20(S)	14( I )	22(S)	Sem halo(R)
<i>C. albicans</i> LM03	17 (S)	Sem halo(R)	14( I )	13( I )	Sem halo(R)
<i>C. albicans</i> LM04	17 (S)	19(S)	23(S)	21(S)	Sem halo(R)
<i>C. tropicalis</i> LM05	13 (S)	21(S)	15( I )	20( I )	Sem halo(R)
<i>C. tropicalis</i> LM06	13 (S)	16(S)	17( I )	20( I )	Sem halo(R)
<i>C. tropicalis</i> LM07	13 (S)	17(S)	14( I )	19( I )	Sem halo(R)
<i>C. tropicalis</i> LM08	15 (S)	26(S)	18( I )	Sem halo(R)	Sem halo(R)

\*Halo de inibição (mm) - (S): Sensível; (I): Intermediário; (R): Resistente;

### 3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Os valores da CIM e CFM do extrato das folhas da *S. brasiliensis* Engl. e do antifúngico padrão-ouro, Nistatina, estão expressos na Tabela 03. Foi observado efeito antifúngico do extrato sobre todas as cepas testadas, com CIM e CFM entre 15,6 e 250 µg/mL. *C. tropicalis* LM08 foi a cepa mais susceptível a ação do extrato, apresentando uma CIM <15,6 µg/mL. As mais resistentes foram *C. albicans* LM02 e *C. tropicalis* LM07 com CIM=250 µg/mL. Os veículos utilizados no teste não afetaram o crescimento fúngico.

A razão CFM/CIM revelou a atividade fungicida do extrato para a maioria das espécies analisadas, com exceção de *C. albicans* LM01 e *C. albicans* LM03 onde o efeito foi fungistático (SIDDIQUI et al, 2013).

**Tabela 03. Atividade antifúngica do extrato das folhas da *S. brasiliensis* Engl. sobre *Candida* spp. (valores de CIM e CFM expressos em µg/mL)**

Cepa	<i>S. brasiliensis</i> Engl.			Nistatina		
	CIM	CFM	Razão CFM/CIM	CIM	CFM	Razão CFM/CIM
<i>C. albicans</i> LM01	62,5	250	4	6	6	1
<i>C. albicans</i> LM02	250	250	1	12	12	1
<i>C. albicans</i> LM03	31,2	125	4	12	12	1
<i>C. albicans</i> LM04	31,2	31,2	1	6	12	2
<i>C. tropicalis</i> LM05	62,5	62,5	1	12	12	1
<i>C. tropicalis</i> LM06	125	125	1	12	12	1
<i>C. tropicalis</i> LM07	250	250	1	12	12	1
<i>C. tropicalis</i> LM08	<15,6	<15,6	1	1,5	1,5	1

#### 4. DISCUSSÃO

Diante das limitações de uso dos antifúngicos sintéticos, evidenciadas pelo aumento da resistência dos microrganismos, bem como pelas reações indesejadas apresentadas pelos usuários, há um estímulo na busca por novas substâncias com propriedades antimicrobianas que venham colaborar na terapêutica de doenças, inclusive na prática odontológica (KUNAMOTO, 2002, JEWTUCHOWICZ et al, 2007).

A suscetibilidade a antifúngicos pode variar entre as diferentes espécies de *Candida* spp.. Em pacientes com infecções recorrentes, hospitalizados ou imunodeprimidos cepas anteriormente sensíveis passam a demonstrar perfil de resistência (PFALLER et al, 2006, DA MATTA et al, 2007).

O perfil de sensibilidade das cepas utilizadas nesse estudo demonstra maior resistência aos antifúngicos azólicos, principalmente o Fluconazol que não demonstrou atividade frente a 87,5% das cepas (n=7). Entretanto, os poliênicos testados, Anfotericina B e Nistatina, apresentaram efeito sobre quase 100% das cepas, evidenciando ser uma alternativa terapêutica eficiente para o tratamento da candidose. Outro estudo que utilizou espécies de *Candida* coletadas da cavidade bucal também demonstrou maior efetividade dos poliênicos, Nistatina e Anfotericina B, com 100% das cepas sensíveis, enquanto pelo menos um microrganismo apresentou resistência aos antifúngicos azóis testados (Cetoconazol, Fluconazol, Itraconazol e Miconazol), com o Fluconazol chegando a 40% de resistência sobre *C. albicans* e *C. tropicalis* (AMORIM, 2012).

Fuentefria et al (2016), avaliou o efeito de azóis frente a 114 leveduras de *Candida* armazenadas em uma micoteca e verificou 22% de cepas resistentes ao Fluconazol. Todavia, outras investigações não demonstram diferenças estatisticamente significantes entre as duas classes de antifúngicos ou demonstram maior eficácia de azóis quando comparados com poliênicos (SARAIVA et al, 2011, 2013, SILVA et al, 2012), enquanto estudos como o realizado por Dalazen et al (2011) com cepas coletadas da cavidade bucal de idosos com candidose demonstrou um perfil de alta resistência diante das duas classes de antifúngicos Fluconazol (93,3%), Miconazol (73,3%) e Anfotericina B (96,6%).

Tais estudos revelam a variabilidade dos resultados de investigações que envolvem a sensibilidade de microrganismos, dificultando análises comparativas. Pode-se sugerir que essa variação decorra das diferenças metodológicas, bem como da origem e espécie dos microrganismos utilizados. É importante ressaltar ainda que nos casos de tratamento com medicação sistêmica os azóis são a única classe de antifúngicos que podem ser administrados por via oral e por isso são amplamente utilizados nos setores primários de saúde, sendo essa uma das razões apontadas para o aumento do perfil de resistência das leveduras (ARENDRUP, 2013). Por outro lado, os poliênicos possuem baixa solubilidade e elevada toxicidade no hospedeiro o que limita a sua utilização na terapia antifúngica em longo prazo e reduz a aquisição de resistência pelas leveduras (PEREA; PATTERSON, 2002). Dessa forma, compreende-se a importância de serem realizados antifungogramas para identificar qual a levedura envolvida e definir o tratamento mais eficiente para cada caso, evitando tratamentos ineficazes e o desenvolvimento de resistência microbiana, principalmente em pacientes imunodeprimidos e que necessitam ou já fizeram uso prolongado de antifúngicos.

Quanto à atividade antifúngica o extrato de folhas de *S. brasiliensis* Engl. pode ser considerado um produto natural de atividade forte, visto que as CIM's para todas as leveduras testadas foram menores que 500 µg/mL (DUARTE et al, 2007). De acordo com a classificação estabelecida por Siddiqui et al (2013), a razão CFM/CIM revela uma atividade fungicida para maioria das cepas testes, com exceção da *C. albicans* LM01 e *C. albicans* LM03. Esses resultados apontam para o potencial de *S. brasiliensis* Engl. para tratamento de infecções causadas por *Candida* spp. Estudos que confirmam o potencial antifúngico dessa planta frente a diferentes espécies de *Candida* são relatados na literatura (SARAIVA et al, 2011, 2013, CHAVES et al, 2011; JOVITO, 2016).

Nos estudos de Saraiva et al (2011) e Saraiva et al (2013) o material da planta utilizado também foi a folha e a atividade antifúngica foi demonstrada com halos de inibição chegando a 20mm, sendo classificado como um produto natural muito ativo segundo a classificação de Alves et al (2000). Estudos que utilizaram o extrato da casca ou o óleo essencial da planta não obtiveram resultados tão promissores (SILVA et al 2012, DONATI et al, 2014). É válido destacar ainda que a maioria dos estudos disponíveis na literatura utiliza o método de difusão em ágar,

enquanto utilizamos nessa investigação a microdiluição em meio líquido e que a origem dos fungos varia entre fungos de coleção e cepas clínicas, porém nenhum outro utilizou cepas coletadas da cavidade bucal.

A *S. brasiliensis* Engl. possui atividade antimicrobiana com amplo espectro de ação em estudos *in vitro* envolvendo, além de fungos, bactérias gram-negativas e gram-positivas. Essa forte atividade é atribuída a metabólitos secundários como flavanóides e taninos que quando isolados repetem o efeito antimicrobiano (CHAVES et al, 2011, MOREIRA, 2009). Quanto a toxicidade, Saraiva et al (2011) avaliaram o efeito sobre larvas de *Artemia salina* Leach e evidenciaram uma toxicidade moderada. Em um estudo onde a citotoxicidade sobre leucócitos polimorfos nucleares humanos foi investigada, observou-se biocompatibilidade com uma indução da proliferação celular (JOVITO, 2016).

Apesar dos promissores resultados da *S. brasiliensis* Engl. em estudos *in vitro*, essa planta ainda foi pouco explorada quanto aos seus efeitos biológicos e os mecanismos de ação a eles relacionados, bem como quanto a toxicidade para o organismo humano. Sendo assim, novos estudos precisam ser realizados para suportar futuros ensaios clínicos que possam conduzir a uma possível aplicação clínica da planta.

## 5. CONCLUSÃO

O perfil de sensibilidade das cepas avaliadas demonstrou diferença de susceptibilidade entre os antifúngicos testados, sendo os poliênicos mais eficazes que os azóis. O extrato da folha da *S. brasiliensis* Engl. possui atividade antifúngica sobre cepas clínicas do gênero *Candida*, apresentando efeito fungicida para maioria das leveduras.



***In vitro* effect of *Schinopsis brasiliensis* Engl. leaf extract on *Candida* spp. involved in oral infections**

**ABSTRACT**

**Objective:** Characterize the susceptibility profile of clinical isolates *Candida* spp. against different antifungals and to investigate the antifungal effect of leaf extract of *Schinopsis brasiliensis* Engl. on clinical strains of *Candida* collected from the oral cavity. **Methods:** Characterization of the fungal sensitivity profile of *Candida albicans* (n = 4) and *Candida tropicalis* (n = 4) the test strains was determined by the disk diffusion test protocol reported by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicide Concentration (CFM) of the extract were determined on clinical strains of *Candida* spp. collected from the oral cavity, with the microdilution technique in liquid medium and the subculture seeding, respectively. **Results:** In the sensitivity profile only one strain of *C. albicans* showed susceptibility to the effect of all antifungal tested, while all other yeasts were resistant to at least one antifungal. The antifungal effect of the extract was observed on all strains tested, with MIC and CFM between 15.6 and 250 µg / mL. The CFM / MIC ratio revealed the fungicide activity of the extract for most of the species analyzed. **Conclusion:** The sensitivity profile of the strains evaluated demonstrated a difference in susceptibility among the tested antifungals, being the polyenes more effective than the azole. The leaf extract of *S. brasiliensis* has antifungal activity on clinical strains of the genus *Candida*, presenting fungicidal effect for most yeasts.

**KEY WORDS:** *Candida*. Antifungal Agents. Plants, Medicinal.

## REFERÊNCIAS

Aikawa NE, Rosa DT, Del Negro GM, Moraes JC, Ribeiro AC, Saad CG, Bonfá E. Infecção sistêmica e localizada por *Candida* spp. em pacientes reumatológicos em terapia anti-TNF. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 56, n. 6, p. 478-482, 2016.

Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. **Postgraduate medical journal**, v. 78, n. 922, p. 455-459, 2002.

Almeida Paiva LC, Ribeiro A, Pereira J V, Oliveira NMC. Avaliação clínica e laboratorial do gel da *Uncaria tomentosa* (Unha de Gato) sobre candidose oral. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, p. 423-428, 2009.

Alves PM, Leite PHAS, Pereira JV, Pereira LF, Pereira MS, Higino JS, Lima EO. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn.(goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação in vitro. **Rev Bras Farmacogn**, v. 16, n. 2, p. 192-196, 2006.

Alves TMDA, Silva AF, Brandão M, Grandi TSM, Smânia EDFA, Smânia Júnior A, Zani CL. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.

Amorim MCL. Identificação de espécies de *Candida* na cavidade bucal e susceptibilidade antifúngica em pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço e portadores de prótese removível, 2012.

Arendrup MC. *Candida* and candidaemia. Susceptibility and epidemiology. **Dan Med J**, v. 60, n. 11, p. B4698, 2013.

Canuto MM, Rodero FG. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 9, p. 550-563, 2002.

Cardoso FL, Murakami C, Mayworm MAS, Marques LM. Análise sazonal do potencial antimicrobiano e teores de flavonoides e quinonas de extratos foliares de *Aloe arborescens* Mill., Xanthorrhoeaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 35-40, Jan./Mar, 2010.

Carvalho PER. Braúna-do-Sertão-*Schinopsis brasiliensis*. **Embrapa Florestas- Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2009.

Carvalho PER. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**; Colombo: Embrapa Florestas: 2008. *caryophyllene and myrcene*. Nat. Prod. Res. 29, 939–946, 2014.

Cavalcanti YW, Almeida LDFD, Padilha WWN. Atividade antifúngica de três óleos essenciais sobre cepas de *Candida*. **Revista Odontológica do Brasil Central**, v. 20, n. 52, 2011.

Chaves TP, Barbosa AS, Nunes LE, da Silva KMA, da Silva Simões MO, Santos RL, Medeiros ACAD. Evaluation of the potential modulator of bacterial resistance, acute toxicity and chemical composition of *Schinopsis brasiliensis* Engl. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.9, n.33, p.843-849,2015.

Chaves TP, Dantas IC, Felismino DC, Vieira KVM, Clementino ELC, Costa LS. Atividade antimicrobiana das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engler. **Biofar**, v. 5, n. 2, p. 11-17, 2011.

Colombo AL, Guimarães T, Camargo LFA, Richtmann R, de Queiroz-Telles F, Salles MJC, Nucci M. Brazilian guidelines for the management of candidiasis—a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 283-312, 2013.

Dalazen D, Zanrosso D, Wanderley L, da Silva NL, Fuentefria AM. Comparação do perfil de suscetibilidade entre isolados clínicos de *Candida* spp. orais e vulvovaginais no Sul do Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 1, p. 33-38, 2011.

Dantas TB. Atividade antifúngica in vitro de timol sobre cepas do gênero *Penicillium*. 100 f. Dissertação (Mestrado em em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, 2013.

Deswal DP, Chand U. Standardization of the tetrazolium test for viability estimation in ricebean (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & ohashi) seeds. **Seed Science and Technology**, v. 25, n. 3, p. 409-417, 1997.

Dias CDV, da Silva PP, Kiill L. Morfologia e dispersão de frutos de *Schinopsis brasiliensis* (Anacardiaceae) na Reserva Legal do Projeto Salitre, Juazeiro-BA. In: **Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMI-ÁRIDO, 2., 2007, Petrolina. Anais... Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2007.

Diniz DN, Macêdo-Costa MR, Pereira MDSV, Pereira JV, Higino JS. Efeito antifúngico in vitro do extrato da folha e do caule de *Myrciaria cauliflora* berg. sobre microrganismos orais. **Rev. odontol. UNESP (Online)**, p. 151-156, 2010.

Donati M, Mondin A, Chen Z, Miranda FM, do Nascimento Jr BB, Schirato G, Froidi G. Radical scavenging and antimicrobial activities of *Croton zehntneri*, *Pterodon emarginatus* and *Schinopsis brasiliensis* essential oils and their major constituents: estragole, trans-anethole,  $\beta$ -caryophyllene and myrcene. **Natural product research**, v. 29, n. 10, p. 939-946, 2015.

Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H, Dwivedi P, Diaz P, Vasilakos J. Characterization of mucosal *Candida albicans* biofilms. **PLoS One**, v. 4, n. 11, p. e7967, 2009.

Duarte MCT, Leme EE, Delarmelina C, Soares AA., Figueira GM, Sartoratto A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 111, n.2, p. 197-201, 2007.

Eliopoulos GM, Perea S, Patterson TF. Antifungal resistance in pathogenic fungi. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n. 9, p. 1073-1080, 2002.

Fuentefria A, Andrade S, Andrade S, Silveira G, Silveira G, Kulkamp I, Martins AF. Caracterização do perfil de susceptibilidade a antifúngicos azólicos de uma micoteca como embasamento para estratégias de combate à candidemias. **Journal of Infection Control**, v. 5, n. 1, 2016.

Gavaldà J, Ruiz I. Recomendaciones para el tratamiento de la infección fúngica invasiva. Infección fúngica invasiva por *Candida* spp. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 21, n. 9, p. 498-508, 2003.

Geusau A, Antoniewicz L, Poitschek C, Presterl E, Willinger B. In vitro susceptibility of *Candida* isolates from organ transplant recipients to newer antifungals. **Mycopathologia**, v. 177, n. 3-4, p. 143-156, 2014.

Grossi PA. Clinical aspects of invasive candidiasis in solid organ transplant recipients. **Drugs**, v. 69, n. 1, p. 15-20, 2009.

Jewtuchowicz VM, Brusca MI, Mujica MT, Gliosca LA, Finkelievich JL, Lovannitti C A, Rosa AC. Subgingival distribution of yeast and their antifungal susceptibility in immunocompetent subjects with and without dental devices. **Acta odontologica latinoamericana: AOL**, v. 20, n. 1, p. 17-22, 2007.

Jovito VDC. Atividades anti-Candida e análise da citotoxicidade do extrato da folha da *Schinopsis brasiliensis* Engl. 2016.

Kauffman CA, Carver PL. Update on echinocandin antifungals. In: **Seminars in Respiratory and critical care medicine**. © Thieme Medical Publishers, p. 211-219, 2008.

Kiill LHP, Martins CDV, da Silva PP. Morfologia e dispersão dos frutos de espécies da Caatinga ameaçadas de extinção. **Embrapa Semiárido-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2012.

Kumamoto CA. Candida biofilms. **Current opinion in microbiology**, v. 5, n. 6, p. 608-611, 2002.

Marcos Saraiva A. Estudo Farmacognóstico e Determinação da Atividade Biológica de *Caesalpinia pyramidalis* Tull. E *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA Multirresistentes. Recife, 184 p. Dissertação (Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde Universidade Federal de Pernambuco, 2007.

Marsh PD. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. **Journal of Dentistry**. 38. 11-15, 2010.

Martins IMCLD. Avaliação da ação antifúngica de *Citrus Limon* Linn. frente a leveduras do Gênero *Candida*. Dissertação (Mestrado em Diagnóstico Oral)- Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal da Paraíba, 2009.

Matta DA, Almeida LPD, Machado AM, Azevedo AC, Ura Kusano EJ, Travassos NF, Colombo AL. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in Sao Paulo, Brazil, 1995–2003. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 57, n. 4, p. 399-404, 2007.

Mitchell KF, Taff HT, Cuevas MA, Reinicke EL, Sanchez H, Andes DR. Role of matrix  $\beta$ -1, 3 glucan in antifungal resistance of non-albicans *Candida* biofilms. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1918-1920, 2013.

Mohr J, Johnson M, Cooper T, Lewis JS, Ostrosky-Zeichner L. Current options in antifungal pharmacotherapy. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 28, n. 5, p. 614-645, 2008.

Molina FP, Majewski M, Perrela FA, de Oliveira LD, Junqueira JC, Jorge AOC. Própolis, sálvia, calêndula e mamona—atividade antifúngica de extratos naturais sobre cepas de *Candida albicans*. **Brazilian Dental Science**, v. 11, n. 2, 2010.

Moreira BO. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante dos extratos hexânico e diclorometânico das folhas de *Schinopsis brasiliensis* engl.(Anacardiaceae), 2009.

Muñoz P, Guinea J, Rojas L, Bouza E. New antifungal agents for the treatment of candidaemia. **International journal of antimicrobial agents**, v. 36, p. S63-S69, 2010.

Muzyka BC, Epifanio RN. Update on oral fungal infections. **Dental Clinics**, v. 57, n. 4, p. 561-581, 2013.

Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Massey R, Holoyda K, Hoff B, Andes, D. Putative role of  $\beta$ -1, 3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 510-520, 2007.

Nishi I, Sunada A, Toyokawa M, Asari S, Iwatani Y. In vitro antifungal combination effects of micafungin with fluconazole, voriconazole, amphotericin B, and flucytosine against clinical isolates of *Candida* species. **Journal of infection and chemotherapy**, v. 15, n. 1, p. 1-5, 2009.

OA Menezes T, CS Gillet, L, AF Menezes, S, NM Feitosa R., OG Ishak, M, Ishak R, CR Vallinoto. A. Virulence factors of *Candida albicans* isolates from the oral cavities of HIV-1-positive patients. **Current HIV research**, v. 11, n. 4, p. 304-308, 2013.

Pereira JFS. Avaliação do potencial antimicrobiano do extrato da casca de *Schinopsis brasiliensis* Engler. Um estudo baseado na indicação etnofarmacológica. Campina Grande. 60f. Trabalho Orientado Acadêmico- Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/ Universidade Estadual da Paraíba, 2007.

Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. Supplement\_1, p. S3-S14, 2006.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier. Cap. 48, p. 692-697, 2007.

Samaranayake LP, Keung Leung W, Jin L. Oral mucosal fungal infections. **Periodontology** 2000, v. 49, n. 1, p. 39-59, 2009.

Saraiva AM, Castro RH, Cordeiro RP, Sobrinho TJP, Castro VT, Amorim EL, Pisciotano MN. In vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial and toxicity properties of extracts of *Schinopsis brasiliensis* Engl.(Anacardiaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 14, p. 1724-1731, 2011.

Saraiva AM, Saraiva C L, Cordeiro RP, Soares RR, Xavier HS, Caetano N. Atividade antimicrobiana e sinérgica das frações das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a clones multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Rev. bras. plantas med**, v. 15, n. 2, p. 199-207, 2013.

Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Giannini MM. *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. Pt 1, p. 10–24, jan. 2013.

Sena MF, Gondim LAM, de Araújo Souza GC, Ferreira MÂF, Lima KC. Tratamento de candidíase oral em pacientes com câncer de cabeça e pescoço: uma revisão sistemática. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, v. 53, n. 3, p. 241-245, jul/set. 2009.

Seneviratne CJ, Jin L, Samaranayake LP. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. **Oral diseases**, v. 14, n. 7, p. 582-590, 2008.

Serracarbassa PD, Dotto P. Endoftalmite por *Candida albicans*. **Arq Bras Oftalmol**, p. 701-707, 2003.

Sesma N, Morimoto S. Estomatite protética: etiologia, tratamento e aspectos clínicos. **Journal of Bi dentistry and Biomaterials** - Universidade Ibirapuera São Paulo ;(2), 24-29,2011.

Siddiqui ZN, Farooq F, Musthafa TM, Ahmad A, Khan AU. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 237-243, 2013.

Silva TB, Rangel ET. Avaliação da Atividade Antimicrobiana do Extrato Etanólico do Tomilho (*Thymus Vulgaris* L.) in vitro. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 7, n. 2, p. 48– 58, 2010.

Standards NCFCL. Reference Methods for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast: Approved Standard. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, ISBN 1562384694, 2002.

Stramandinoli RT, Souza PHC, Westphalen FH, Bisinelli JC, Ignácio AS, Yurgel LS. Prevalência de candidose bucal em pacientes hospitalizados e avaliação dos fatores de risco. **RSBO (Online)**, v. 7, n. 1, p. 66-72, 2010.

Tavares AC, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Cruz MT, Lopes MC, Canhoto J, Salgueiro LR. Essential oil of *Daucus carota* subsp. *halophilus*: composition, antifungal activity and cytotoxicity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 1, p. 129-134, 2008.

Terézhalmy GT, Huber MA. Oropharyngeal candidiasis: Etiology, epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, and treatment. **Crest Oral-B at dentalcare. com Contin Educ Course**, p. 1-16, 2011.

Vandeputte P, Ferrari S, Coste AT. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International Journal of Microbiology** 2, doi: 10.1155/2012/713687, 2012.

Vasconcellos AA, Gonçalves LM, Cury AADB, da Silva WJ. Candida-associated denture stomatitis: Clinical relevant aspects. In: **Oral Candidosis**. Springer Berlin Heidelberg, 2015.

Wayne PA. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Method for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. **Approved standard-8th ed., CLSI document M07-A8, USA**, 2009.