

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE
NÚCLEO DE PESQUISA E INOVAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

RAFAEL DE OLIVEIRA CORRÊA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS
VEGETAIS FRENTE AOS PRINCIPAIS MICRORGANISMOS CAUSADORES DA
CANDIDÍASE**

**Juiz de Fora
2017**

RAFAEL DE OLIVEIRA CORRÊA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS
VEGETAIS FRENTE AOS PRINCIPAIS MICRORGANISMOS CAUSADORES DA
CANDIDÍASE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio Fernandes Brandão

Juiz de Fora

2017

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

de Oliveira Corrêa, Rafael.

AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS VEGETAIS FRENTE AOS PRINCIPAIS MICRORGANISMOS CAUSADORES DA CANDIDÍASE / Rafael de Oliveira Corrêa. – 2017.

101 f. : il.

Orientador: Marcos Antônio Fernandes Brandão

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2017.

1. Candidíase. 2. Extratos vegetais. 3. Atividade antifúngica. 4. Toxicidade. I. Antônio Fernandes Brandão, Marcos, orient. II. Título.

RAFAEL DE OLIVEIRA CORRÊA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS
VEGETAIS FRENTE AOS PRINCIPAIS MICROORGANISMOS CAUSADORES DA
CANDIDÍASE**

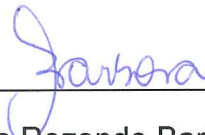
Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Federal de Juiz
de Fora, como parte dos requisitos para
a obtenção do título de Mestre pelo
Programa de Pós-graduação em Saúde
da Universidade Federal de Juiz de Fora

Aprovada em 28 de agosto de 2017.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Marcos Antônio Fernandes Brandão - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora



Profª. Drª. Nádia Rezende Barbosa Raposo
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Hudson Caetano Polonini
Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde

AGRADECIMENTOS

A DEUS, que me encoraja e me guia para prosseguir a caminhada sem fraquejar mesmo frente a grandes obstáculos. Obrigado por permitir que eu contribua com a saúde das pessoas.

Agradeço aos meus pais, Maria Aparecida e Hilton que sempre incentivaram meus estudos e serem exemplos de vida. Aos meus irmãos Juliana e Vinícius pelo grande apoio.

À minha noiva Natália por seguir sempre a meu lado, caminhando junto e somando no dia a dia, te amo!

Aos meus amigos, por estarem sempre comigo e facilitarem a minha vida com momentos de descontração, alegria e encorajamento.

Aos professores Marcos Brandão e Nádía Raposo, obrigado por me oferecerem oportunidades, conselhos, cobranças, sempre me incentivando e ajudando todas as vezes que precisei sempre com muita disponibilidade e paciência e que permitiram a vitória em mais uma etapa.

A todos os colegas do NUPICS por toda ajuda que me ofereceram facilitando o desenvolvimento da pesquisa. Vocês fizeram a diferença!

À Universidade Federal de Juiz de Fora, por toda minha formação repleta de excelentes momentos de aprendizagem e realizações.

A todos, o meu muito obrigado.

“Que a felicidade não dependa do tempo, nem da paisagem, nem da sorte e nem do dinheiro. Que ela possa vir com toda a simplicidade, de dentro para fora, de cada um para todos.”

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

A candidíase acomete a cavidade oral e é uma doença ocasionada pela *Candida albicans* e por outras espécies relacionadas, tais como: *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*. As infecções por cândida consistem atualmente em um problema de Saúde Pública. Isto se deve ao aumento de hospedeiros imunodeprimidos, tratamento prolongado com antibacterianos dentre outros. O uso de agentes antifúngicos eficientes contra leveduras é um importante meio de controle destas infecções bucais. Vários agentes antimicrobianos de origem vegetal estão sendo investigados devido as suas possíveis propriedades farmacológicas. O uso de plantas medicinais é uma prática usual pela população atual sendo que muitas plantas apresentam atividade biológica benéfica ao ser humano. Os extratos vegetais podem contribuir para a produção de medicamentos eficazes. Espécies vegetais como *Ficus insipida* Willd (caxinguba ou cuaxinguba), *Brosimum parinarioides* Ducke (amapá), *Byrsonima intermedia* A. Juss (saratudo), *Curatella americana* (caimbé), *Anacardium spp* (cajuí), apresentam notáveis propriedades antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias e antineoplásicas e por isso, neste estudo foram avaliados seus extratos etanólicos (brutos). Os principais objetivos foram: determinar o potencial antifúngico destes cinco extratos secos dessas espécies vegetais, frente às principais linhagens causadoras de candidíase oral (*Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*) além de estabelecer a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM); verificar as alterações morfológicas e estruturais nas linhagens de *Candida* por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV); avaliar a toxicidade desses extratos em modelos de células de fibroblastos de camundongos (L929) e queratinócitos (HaCaT) e modelo de *Artemia salina*. Os extratos vegetais demonstraram potencial antifúngico com CIM e CFM de 0,0097 μ g/mL e 5 μ g/mL. Por meio das eletromicrografias foi possível evidenciar alterações morfológicas nas estruturas fúngicas das quatro espécies submetidas à ação dos extratos secos selecionados, o que demonstra sua ação sobre os fungos avaliados. Os extratos revelaram baixa toxicidade frente as células L929 e HaCaT e tóxicos para *Artemia salina* (IC₅₀ = 80,70 μ g/mL). Por meio dos resultados apresentados neste trabalho é possível atribuir aos extratos ação antifúngica frente aos principais fungos causadores da candidíase oral. O extrato de *Byrsonima intermedia* apresentou melhor perfil antifúngico, demonstrando ser o mais promissor deles

Palavras-chave: Candidíase. Extratos vegetais. Atividade antifúngica. Toxicidade

ABSTRACT

Candidiasis affects the oral cavity and is a disease caused by *Candida albicans* and other related species, such as *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*. *Candida* infections are currently a public health problem. This is due to the increase of immunosuppressed hosts, prolonged treatment with antibacterial among others. The use of effective antifungal agents against yeasts is an important means of controlling these oral infections. Several antimicrobial agents of vegetable origin are being investigated because of their possible pharmacological properties. The use of medicinal plants is a common practice by the current population and many plants have biological activity that is beneficial to humans. Plant extracts can contribute to the production of effective medicines. Plant species such as *Ficus insipida* Willd (Caxinguba or Cuaxinguba), *Brosimum parinarioides* Ducke (amapá), *Byrsonima intermedia* A. juss (saratudo), *Curatella americana* (caimbe), *Anacardium spp* (cajuí), present remarkable antibacterial, antifungal, antiinflammatory properties and antineoplastic and therefore, in this study were evaluated their (crude) ethanol extracts. The main objectives were: to determine the antifungal potential of these five dry extracts of these plant species, against the main oral *Candida albicans* (*Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. guilliermondii*) lines, besides establishing the minimum inhibitory concentration) and the minimum fungicidal concentration (CFM); to verify the morphological and structural alterations in *Candida* strains by scanning electron microscopy (SEM); to evaluate the toxicity of these extracts in mouse fibroblast cell (L929) and keratinocyte (HaCaT) models and *Artemia saline* model. Plant extracts showed antifungal potential with MIC and CFM of 0.0097 µg / mL and 5 µg / mL. By means of the electromicrographs it was possible to show morphological changes in the fungal structures of the four species submitted to the action of the selected dry extracts, which demonstrates their action on the evaluated fungi. The extracts showed low toxicity to L929 and HaCaT cells and toxic to *Artemia saline* (IC 50 = 80.70 µg / ml). Through the results presented in this work it is possible to attribute antifungal extracts to the main fungi causing oral candidiasis. The extract of *Byrsonima intermedia* presented better antifungal profile, proving to be the most promising of them

Keywords: Candidiasis. Plant extracts. Antifungal activity. Toxicity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Candidíase pseudomembranosa.

Figura 2: Candidíase eritematosa.

Figura 3: Candidíase atrófica crônica.

Figura 4: Grupos de medicamentos para tratamento de candidíase.

Figura 5: Medicamentos indicados para o tratamento das infecções por *Candida albicans*

Figura 6: Etapas da formação de um biofilme multiespécie.

Figura 7: Aspecto da *Byrsonima intermédia*

Figura 8: *Anacardium* spp (cajuí) pertencente à EMBRAPA Meio-Norte/UEP, Parnaíba- PI.

Figura 9: Psoraleno (1) e bergapteno (2).

Figura 10: Compostos, psoraleno (1) e o bergapteno (2).

Figura 11: triterpenos 3 β -acetoxi-olean-12-eno- 28-al e β -sitosterol e a cumarina xantilantina

Figura 12: Estrutura das substâncias isoladas de *B. gaudichaudii* e *B. rubenscens*.

Figura 13: *Brosimum parinarioides*: látex, folhas e tronco, respectivamente.

Figura 14: Eletromicrografias das linhagens de *Candida sp* não expostas aos tratamentos farmacológicos de interesse.

Figura 15: Eletromicrografias das linhagens de *Candida sp* expostas aos fármacos de referência.

Figura 16. Eletromicrografias das linhagens de Nistatina e Anfotericina B. 16a e 16b - MEV de leveduras de *C. glabrata* expostas à Nistatina. 16c e 16d - MEV de *C. glabrata* expostas à Anfotericina B.

Figura 17. Eletromicrografias das linhagens de Nistatina e Anfotericina B. 17a e 17b - MEV de *C.guilliermondii* expostas à Nistatina. 17c e 17d - MEV de *C.guilliermondii* expostas à Anfotericina B. Células com características de achatamento e compressão além de agrupamento celular.

Figura 18 . Eletromicrografias das linhagens de *C. krusei* expostas à Nistatina e Anfotericina B. 18a e 18b - MEV de *C. krusei* expostas à Nistatina. 16c - MEV de *C. krusei* expostas à Anfotericina B.

Figura 19: Eletromicrografias das linhagens de MEV de leveduras de *C.albicans* expostas à (19a) *Brosimum parinarioides*, (19b) *Anacardium occidentale*, (19c) *Curatella americana*, (19d) *Ficus insipida*.

Figura 20: Figura 20. Eletromicrografias das linhagens de MEV de leveduras de *C. glabrata* expostas à (20a) *Brosimum parinarioides*, (20b) *Anacardium occidentale*, (20c) *Curatella americana*, (20d) *Ficus insipida*.

Figura 21: Figura 21. Eletromicrografias das linhagens de MEV de leveduras de *C. guilliermondii* expostas à (21a) *Brosimum parinarioides*, (21b) *Anacardium occidentale*, (21c) *Curatella americana*, (21d) *Ficus insipida*.

Figura 22: Figura 22. Eletromicrografias das linhagens de MEV de leveduras de *C. krusei* expostas à (22a) *Brosimum parinarioides*, (22b) *Anacardium occidentale*, (22c) *Curatella americana*, (22d) *Ficus insipida*.

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1. Concentração dos estratos e suas diluições para testes em água do mar.

Tabela 2. Rendimentos dos extratos secos obtidos após a liofilização.

Tabela 3. Potencial antifúngico dos fármacos de referência e dos extratos de interesse. Resultados expressos em $\mu\text{g/mL}$ *UI/mL.

Tabela 3. Potencial antifúngico dos fármacos de referência e dos extratos de interesse. Resultados expressos em $\mu\text{g/mL}$ *UI/mL

Tabela 4. Resultado das CIM e CFM frente a linhagens de cândidas.

Concentrações de dose letal (DL) em 50% dos microcrustáceos em $\mu\text{g/mL}$.

Gráfico 1. Viabilidade celular da Nistatina e Anfotericina B pelo método MTT frente a linhagens de fibroblasto murinho (L929) (a e b) e queratinócito humano (HACAT)(c).

Gráfico 2. Viabilidade celular da *Byrsonima intermedia* pelo método MTT frente a linhagens de fibroblasto murinho (L929) e queratinócito humano (HACAT).

Gráfico 3. Viabilidade celular da *Brosimum parinarioides* pelo método MTT frente a linhagens de fibroblasto murinho (L929) e queratinócito humano (HACAT).

Gráfico 4. Viabilidade celular da *Anacardium occidentale* pelo método MTT frente a linhagens de fibroblasto murinho (L929) e queratinócito humano (HACAT).

Gráfico 5. Viabilidade celular da *Curatella americana* pelo método MTT frente a linhagens de fibroblasto murinho (L929) e queratinócito humano (HACAT).

Gráfico 6. Viabilidade celular da *Ficus insipida* pelo método MTT frente a linhagens de fibroblasto murinho (L929) e queratinócito humano (HACAT).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1. CANDIDÍASE – CONCEITO E EPIDEMIOLOGIA.....	16
2.2. ETIOLOGIA.....	17
2.3. FATORES DE RISCO.....	19
2.4. FATORES DE VIRULÊNCIA.....	19
2.5. FISIOPATOLOGIA.....	21
2.6. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	21
2.7. ESTOMATITE POR PRÓTESE.....	25
2.8. CANDIDEMIA (INFECÇÕES DISSEMINADAS).....	25
2.9. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS.....	26
2.10. DIAGNÓSTICO.....	27
2.11. TRATAMENTO.....	28
2.12. O PAPEL DA SALIVA.....	31
2.13. BIOFILMES.....	32
2.14. INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS E BACTÉRIAS NA FORMAÇÃO DO BIOFILME E O MECANISMO DE QUÓRUM SENSING.....	34
2.15. MATERIAIS E HIGIENE DA PRÓTESE.....	35
2.16. PROGNÓSTICO.....	36
2.17. PREVENÇÃO.....	37
2.18. PLANTAS MEDICINAIS.....	37
2.18.1. PLANTAS COM POTENCIAL TERAPÊUTICO.....	38
2.18.2. BIOMA AMAZÔNIA.....	39
2.18.3. EXTRATOS VEGETAIS.....	41
2.18.4. TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO.....	42
2.18.5. RENDIMENTO.....	43
2.18.6. ESPÉCIES VEGETAIS DE INTERESSE.....	43
3. OBJETIVOS.....	61
3.1. Geral.....	61
3.2. Específicos.....	61
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	62
4.1. ESPÉCIES VEGETAIS.....	62
4.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS.....	62
4.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	62

4.3.1. ESPÉCIES FÚNGICAS.....	62
4.3.2. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA: DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM).....	63
4.3.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	64
4.3.4. CITOTOXIDADE.....	64
5. RESULTADOS.....	68
5.1. MÉTODO DA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	68
5.2. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	68
6. DISCUSSÃO.....	77
7. CONCLUSÃO>>>>>>>>>.....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

1 – INTRODUÇÃO

A cavidade oral apresenta uma microbiota natural diversa incluindo vírus, bactérias e fungos, mantidos em equilíbrio pelos mecanismos de defesa do organismo. Entretanto, quando há um desequilíbrio nessa harmonia, podem provocar doenças que vão desde uma manifestação inflamatória local até micoses sistêmicas que podem levar o indivíduo à morte (SIQUEIRA *et al.*, 2015).

A candidíase é uma infecção fúngica que acomete mucosas e pele tendo grande incidência na cavidade oral. Suas manifestações variam de acordo com o sítio anatômico acometido e podem ser causadas por espécies como *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* e atingir regiões como orofaringe, pele, genitais, pulmões (KHAN *et al.*, 2016; HEUNG-SHICK, YOUNHEE 2015; KOMENO *et al.*; 2015; SIQUEIRA *et al.*, 2015).

As infecções fúngicas podem ser favorecidas por uma série de fatores sistêmicos como imunossupressão, câncer, antibioticoterapia prolongada, xerostomia, desnutrição, idade, diabetes, gravidez além de fatores locais, tabagismo, doenças preexistentes na mucosa oral, higiene precária e uso de prótese dentária (DE ROSSI *et al.*, 2011; FAVALESSA *et al.*, 2010; CHAHOU *et al.*, 2013; WILSON *et al.*, 2014). Na cavidade oral pode surgir a candidíase aguda pseudomembranosa, comumente conhecida como sapinho, manifestando queilite angular, sensação de queimação, dificuldade na deglutição e fala (COLLINS *et al.*, 2011) além de lesões isoladas ou agrupadas caracterizadas por placas ou nódulos brancos, de bordas eritematosas, assintomáticas ou queixas de ardência ou dor. Nos usuários de próteses, é chamada estomatite protética, candidíase atrófica ou estomatite por prótese apresentando áreas eritematosas crônicas nas regiões cobertas pela prótese (COLOMBO *et al.*, 2013) podendo ocorrer infecções periodontais devido à presença de forma exacerbada da *C. albicans* (SIQUEIRA *et al.*, 2015; SINGH *et al.*, 2016).

Pesquisas no âmbito odontológico de produtos cuja formulação possui extratos de plantas capazes de reduzir a atividade de microrganismos bucais têm aumentado nos últimos anos. O conhecimento sobre o potencial terapêutico das

plantas medicinais tem despertado interesse científico e abrindo novos caminhos sendo esta, uma prática já realizada por sociedades antigas. A Organização Mundial da Saúde (OMS) apoia estudos e o uso de plantas medicinais incentivando a fitoterapia (MARREIRO *et al.*, 2014)

A flora amazônica é considerada a maior reserva de plantas medicinais do mundo, e detém uma das regiões de maior biodiversidade do planeta, apresentando inúmeras espécies vegetais com propriedades medicinais relatadas e outras em que seus efeitos terapêuticos são desconhecidos (MENDES, 2011).

A toxicidade é um dos parâmetros cruciais para a avaliação de resposta biológica e do potencial lesivo de causar a morte de células ou tecidos, sendo o primeiro teste de escolha utilizado para quase todas as novas substâncias, sendo este um passo importante antes de sua aplicação clínica na cavidade bucal. Novos produtos com maior atividade farmacológica, menor toxicidade e custos mais acessíveis à população fornecidos pelos produtos naturais podem ser encontrados. Além disso, a utilização de cultura de células em pesquisas para estudo de biocompatibilidade de materiais tem possibilitado reproduzir condições e até reações semelhantes às ocorridas no organismo permitindo observar e quantificar alterações sofridas pelas células frente a um determinado produto ou medicamento, bem como o comportamento de cada componente celular isoladamente (MARREIRO *et al.*, 2014).

Algumas condutas efetivas como uso de medicamentos antifúngicos e alcalinização do pH bucal já são adotadas no tratamento e controle da candidíase. A Clorexidina a 0,12%, Nistatina e Anfotericina B representam as drogas mais utilizadas no combate a esta enfermidade além da higienização correta de próteses dentárias. Alguns agentes antimicrobianos de origem natural estão sendo investigados como alternativas para minimizar toxicidade das drogas convencionais e por apresentarem propriedades farmacológicas satisfatórias (DE OLIVEIRA, 2012; SIQUEIRA *et al.*, 2015; KHAN, *et al.*, 2016).

As doenças infectocontagiosas na cavidade oral são uma grande preocupação da classe odontológica. Desta forma é necessário que o cirurgião dentista esteja apto para o diagnóstico e tratamento destas enfermidades. A candidíase se destaca dentre outras infecções fúngicas da cavidade oral e deve-se indicar um correto tratamento para combater. A utilização de extratos naturais antifúngicos de algumas plantas é uma alternativa viável e eficiente que vem

demonstrando sucesso. É de suma importância a pesquisa de novos agentes farmacológicos que visam determinar o potencial antifúngico das plantas medicinais e que auxiliem nos tratamentos destas infecções. Por incentivo do Governo Federal, no ano de 2006, algumas práticas integrativas e complementares (PIC) foram incorporadas ao Sistema Único de Saúde (SUS), através da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), na qual se inclui a Fitoterapia, surgindo como opção preventiva e terapêutica aos seus usuários. Dessa forma este estudo teve como objetivo a avaliação *in vitro* da atividade antifúngica dos extratos vegetais *Byrsonima intermedia* (saratudo), *Anacardium occidentale* (cajuí), *Ficus insipida* Willd (cuaxinguba), *Brosimum parinarioides* (amapá), *Curatella americana* (caimbé) frente aos principais microrganismos causadores da candidíase.

2 - REVISAO DA LITERATURA

2.1 – Candidíase – conceito e epidemiologia

A candidíase é a infecção oral mais comum em humanos e se expressa em diferentes manifestações. A aderência dos microrganismos é um pré-requisito para que esse processo patológico se inicie. É uma doença causada por um fungo do gênero *Candida*, constituído de aproximadamente 200 espécies diferentes de leveduras, que vivem normalmente nos mais diversos nichos corporais medindo aproximadamente de 2 a 6µm e se reproduzem por brotamento sendo que a maior parte das espécies formam pseudo-hifas e hifas nos tecidos. As colônias têm coloração branca a creme e possuem superfície lisa ou rugosa. Várias espécies de *Cândida* são colonizadoras da microbiota normal da pele, do trato gastrointestinal e geniturinário vivendo como comensais (PEIXOTO *ET al.*, 2014).

Enquanto *C. albicans* é a mais comumente isolada na mucosa oral, *C. glabrata* surge frequentemente aderida às superfícies de acrílico e à mucosa palatal. Anteriormente considerada como não patogênica, hoje essa espécie surge associada a casos de mortalidade. Essa mudança de prevalência tem sido induzida, supostamente, pelo uso indiscriminado de antifúngicos. Outros estudos apontam também a substituição de *C. albicans* por *C. dubliniensis* após a utilização de antifúngicos, especialmente o Fluconazol. No Brasil, a venda desses medicamentos não é controlada, apesar da lei exigir a prescrição médica, como ocorre atualmente com os antibióticos, os quais contam com um sistema de gerenciamento exclusivo para sua comercialização. Apesar de a *Candida albicans* representar a espécie mais comum, metade dos casos de infecção associados ao gênero *Candida*, em todo o mundo, são provocados por outras espécies. *C. albicans* está presente nos estágios iniciais da formação dos biofilmes, o que não acontece nos sistemas mais antigos, onde há substituição por outras espécies (GASPAROTO *et al.*, 2009; MÍMICA *et al.*, 2009; MELO, GUERRA 2014).

Sua proliferação e organização dentro do biofilme definem a condição clínica de sua manifestação. Alguns fatores como sua estrutura, composição de superfície, propriedades químicas e físicas dos microrganismos podem influenciar em sua adesão como a morfologia do substrato (KHAN *et al.*, 2016). Como colonizantes, essas espécies não causam infecção a não ser que haja um desequilíbrio nos mecanismos de defesa ou fatores externos, como por exemplo, o uso de antimicrobianos, que podem alterar a flora normal, tendendo a manifestações

agressivas tornando-se patogênicas. A infecção por candida acomete preferencialmente as crianças e as pessoas idosas, ou seja, a candidíase é mais frequente em pessoas de faixa etária mais nova e mais avançada (MANGUEIRA *et al.*, 2009; MELO, GUERRA 2014).

Muitas pessoas que fazem uso de próteses dentais são afetadas por candidíase oral em associação com estomatite protética, pois os materiais das próteses como a resina acrílica e silicones representam um perfeito suporte para formação de biofilmes. Elastômeros de silicone proporcionam uma interface ideal para colonização por microrganismos e consequente agressão da cavidade oral. É difícil evitar a adesão de microrganismos patogênicos na superfície de materiais dentários apesar de alguns esforços já realizados. A limpeza das próteses dentaria é fundamental para manter a estética e prevenir contra estomatites protética sendo a higienização adequada das próteses efetiva na prevenção e na cura desta patologia. Um produto ideal para higienização de próteses dentaria deve ser biocompatível, bactericida e fungicida, inofensivo às estruturas dentais, de efetiva remoção orgânica e inorgânica de depósitos e de fácil utilização (KHAN *et al.*, 2016).

Embora o número de adentados venha caindo ao longo dos anos, fator relacionado ao acesso à informação e aos serviços de saúde bucal, o país passa por um processo de envelhecimento em que os idosos são mais propensos a apresentar infecções fúngicas devido à queda natural da imunidade e à presença de doenças comuns nessa fase da vida. Diante dessa demanda, fica clara a necessidade de um estudo sobre as patologias associadas aos usuários de próteses dentárias, principalmente aquelas de origem fúngica (MELO GUERRA, 2014).

2.2 – Etiologia

A candidíase é causada pela *Candida albicans* e por outras espécies relacionadas, tais como: *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis*, *C. guilliermondi*, *C. stellatoidea* (SHAFER *et al.*, 1987; REGEZI & SIUBBA, 2000). Para esta doença se desenvolver é necessário que a flora microbiana sofra alterações e esteja com baixa capacidade competitiva favorecendo, assim, o crescimento do fungo. Como fatores associados ao desenvolvimento da candidíase, a umidade e a maceração da pele por agentes mecânicos ou químicos contribuem para sua proliferação (NETO *et al.*, 2005).

A *C. albicans* é a espécie mais comum causadora de infecção nos humanos e o patógeno principal da candidíase oral. Outras espécies também podem ser identificadas com frequência, como a *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida guilliermondii* (AVRELLA, GOULART, 2008; PEIXOTO *et al.*, 2014). Vale lembrar que existem casos onde são identificadas duas ou mais espécies simultaneamente. O interesse pela *C. albicans* se dá em função da facilidade de seu isolamento e por sua constante associação às infecções adquiridas em ambiente nosocomial. Tendo em vista que a colonização por duas ou mais espécies seja comum, essa associação pode dificultar o tratamento. *C. glabrata* e *C. krusei*, por exemplo, são frequentemente resistentes ao fluconazol, fármaco tido como uma das principais alternativas no tratamento da candidíase, indicando a necessidade de mais estudos sobre espécies não-*albicans* (GABLER *et al.*, 2008; MÍMICA *et al.*, 2009; OLIVEIRA, 2009; PEREIRA-CENCI, 2008; MELO, GUERRA 2014).

A candidíase pode ser de origem endógena, quando oriunda da microbiota; ou exógena, transmitida por outro indivíduo. Doenças causadas por fungos ganharam maior atenção nas últimas décadas principalmente com o advento da AIDS, avanços nas terapêuticas de doenças de base, maior uso de antibacterianos, aprimoramento de técnicas de transplantes, com a maior sobrevivência de pacientes. Alguns autores relacionaram vários fatores predisponentes gerais para esta doença, tais como: idade, alcoolismo, gravidez, imaturidade imunológica da infância, câncer avançado, absorção deficiente de nutrientes, quimioterapia, endocrinopatias (diabetes, hipoparatiroidismo, hipoadrenalismo), desnutrição e condição de debilidade. A utilização de agentes terapêuticos como os corticosteroides, antibióticos e agentes imunossupressores também podem contribuir para o aparecimento da doença (CASTRO, 2000; REGEZI & SIUBBA, 2000; NETO *et al.*, 2005). Além disso, fatores como fumo; doenças preexistentes na mucosa oral; higiene precária e uso de prótese dentária podem levar ao desenvolvimento da doença. A presença desses eventos, sejam isolados ou associados, favorecem ao desequilíbrio do binômio micro-organismo/hospedeiro, condição na qual as defesas do indivíduo ficam comprometidas, permitindo o crescimento desordenado do fungo e a invasão de tecidos, características da doença infecciosa oportunista (WINGETER *et al.*, 2007; GABLER *et al.*, 2008; GOMPertz *et al.*, 2008; NETO *et al.*, 2005; PEREIRA-CENCI, 2008; FAVALESSA *et al.*, 2010; DE ROSSI *et al.*, 2011).

A influência da saliva, formação de biofilmes e natureza do substrato, bem como variáveis relacionadas ao indivíduo e ao micro-organismo, podem determinar o curso da infecção. Tais informações são vitais para subsidiar o entendimento a respeito do processo patológico em outros sítios, visto que os fungos do gênero *Candida* podem colonizar outros tipos de próteses (PEREIRA-CENCI, 2008). É conveniente destacar que somente a presença do fungo não garante o desenvolvimento da infecção. Em pacientes saudáveis e com dentição completa, a presença da *Candida spp* raramente provoca doenças. Nos usuários de prótese, as manifestações clínicas dependem da interação entre microrganismo e hospedeiro (MELO GUERRA, 2014).

2.3 - Fatores de risco

A candidíase é a infecção fúngica oportunista mais comum, principalmente devido à onipresença deste fungo e também porque aumenta cada vez mais o número de pacientes com fatores de risco para infecção por essa levedura. Os indivíduos com neoplasia hematológica, neutropenia, usuários prévios de agentes citotóxicos e corticosteroides correspondem aos indivíduos com risco de infecção grave por *candida*. Em pacientes internados em unidade de terapia intensiva (UTI) o uso de antimicrobianos de amplo espectro, cateteres intravenosos e ureterais, procedimentos cirúrgicos prévios, insuficiência renal e nutrição parenteral são os principais fatores de risco para infecções graves por *candida*. A epidemia da síndrome da imunodeficiência adquirida humana (SIDA) levou a um aumento significativo destas infecções, sendo que sua manifestação primária nesses pacientes é a muco cutânea, principalmente a candidíase orofaríngea (PEIXOTO, *et al*, 2014).

2.4 - Fatores de virulência

As espécies do gênero *Candida*, principalmente *Candida albicans*, apresentam características que atuam como fatores de virulência, os quais se destacam: dimorfismo; adesinas; produção de enzimas (proteínases e fosfolipases); capacidade de crescer a 37° C e adaptar-se a variações de temperatura e pH; variações fenotípicas (*switching*); formação de biofilmes; moléculas com receptor homólogo à integrina CR3 humana, as quais favorecem a adesão às células epiteliais e capacidade de sobrevivência dentro dos fagócitos; entre outros. Em

contrapartida, o estabelecimento do processo infeccioso compreende uma relação multifatorial, determinada pela interação entre os fatores de virulência do microrganismo e os fatores predisponentes, associados ao hospedeiro. Dimorfismo é a capacidade de se diferenciar da forma leveduriforme para a forma filamentosa sendo as hifas, como exemplo, o que a torna uma formas mais invasiva, conferindo ao fungo maior poder de penetração nos tecidos e formação de biofilmes por isso, *C. albicans* é uma espécie tão versátil. Já as formas leveduriformes não penetram através das células epiteliais, prevalecendo na população quando em comensalismo (AVRELLA; GOULART, 2008; GOMPERTZ *et al.*, 2008; MENEZES *et al.*, 2005; OLIVEIRA, 2009; PEREIRA-CENCI *et al.*, 2008; DE ROSSI *et al.*, 2011).

O dimorfismo da *C. albicans* exerce papel relevante na manutenção da estrutura do biofilme. É importante para a transição do fungo comensal ao patogênico, bem como na manutenção da doença, pois garante a estrutura do complexo. Segundo Pereira (2009), as camadas iniciais dos biofilmes são formadas pelo fungo na forma de levedura e as demais, pelo fungo filamentoso. A adesão do fungo às células do hospedeiro é mediada pelas adesinas, e a expressão destas moléculas sofre influência de fatores ligados tanto ao ambiente quanto ao hospedeiro. A ação das adesinas é essencial para que o fungo sobreviva superficialmente aderido às células epiteliais ou internalizado por elas (PEREIRA, 2009; DE ROSSI *et al.*, 2011).

Variações fenotípicas (*switching*) contribuem com a patogenicidade do fungo, uma vez que conferem a possibilidade de expressar fatores de virulência e alteração de sua antigenicidade, permitindo a colonização de nichos diferentes. Essas variações são importantes principalmente no processo de invasão do hospedeiro. Quando o fungo assume a forma de blastoconídios, induz as células epiteliais a realizarem sua internalização (fagocitose atípica). Quando em forma de hifas, o processo invasivo se dá através das junções celulares, em um processo chamado de tigmotropismo das hifas (ÁLVARES *et al.*, 2007; DE ROSSI *et al.*, 2011). A produção de enzimas hidrolíticas conferem à *C. albicans* ferramentas necessárias ao processo de invasão do hospedeiro, agindo na degradação de membranas e digestão de proteínas, o que dificulta a atividade do sistema imune. As SAPs ou aspargil proteases são as proteinases mais conhecidas envolvidas nos processos de invasão do hospedeiro, onde SAP 1 e SAP 3 são mais frequentes nas infecções da mucosa oral e SAP 1 e SAP 10 são responsáveis pelas atividades proteolíticas

extracelulares. Há evidências de que apenas *C. albicans* produza fosfolipases (AVRELLA, GOULART, 2008; DE ROSSI *et al.*, 2011).

2.5 – Fisiopatologia

A forma habitual de infecção por *Candida* é o deslocamento de seu nicho normal para a corrente sanguínea ou outros tecidos. A primeira tentativa de defesa do hospedeiro é a fagocitose e a destruição por neutrófilos, monócitos e macrófagos. Assim sendo, muitos mecanismos que operam no interior de neutrófilos e macrófagos provocam a destruição das leveduras. A imunidade celular também participa na defesa contra a infecção por *Candida*, sendo que as células T são responsáveis pela imunidade contra *Candida* em superfícies mucosas (PEIXOTO *et al.*, 2014).

2.6 - Manifestações clínicas

Clinicamente, as manifestações bucais da candidíase são variáveis, sendo observadas numerosas formas de expressão, sendo a forma aguda pseudomembranosa, conhecida popularmente como sapinho, a mais comum. As lesões são caracterizadas por placas ou nódulos brancos, de consistência variável, podendo suas bordas apresentarem-se eritematosas. Podem ser assintomáticas ou pode haver queixa de dor ou ardência (MANGUEIRA *et al.*, 2010).

As manifestações da doença variam de acordo com o sítio anatômico acometido, classificadas em três grandes grupos: mucocutânea (atinge mucosa oral e vaginal), cutânea e sistêmica, onde há comprometimento de vários órgãos e/ou sistemas. A candidíase oral, também chamada de estomatite cremosa ou popularmente sapinho, caracteriza-se pelo aparecimento de placas brancas, isoladas ou agrupadas aderidas à mucosa. Possuem aspecto membranoso e, às vezes, são rodeadas por halo eritematoso (GOMPERTZ *et al.*, 2008; NETO *et al.*, 2005). Nos usuários de próteses, é chamada estomatite protética, candidíase atrófica ou estomatite por prótese (AVRELLA, GOULART, 2008; PEREIRA-CENCI, 2008; TAVARES, 2009; MELO, GUERRA, 2014).

A candidíase pode ter sua apresentação nas formas aguda, crônica ou mucocutânea. As manifestações bucais da candidíase são apresentadas de forma completa e detalhada em sete formas predominantes de candidíase, sendo duas agudas: candidíase pseudomembranosa e candidíase atrófica (candidíase

eritematosa, estomatite ou glossite por antibióticos); duas crônicas: candidíase atrófica (estomatite por dentadura) e candidíase hiperplásica (leucoplasia por *Candida* ou candidíase tipo “leucoplasia”) e, finalmente, três formas mucocutâneas: localizada (boca, face, couro cabeludo, unhas), familiar e associada a síndromes (REGEZI & SCIUBBA, 2000; NETO *et al.*, 2005).

Na candidíase aguda há formação de pseudomembrana esbranquiçada que resulta em uma base eritematosa, quando removida. As formas crônicas da doença são conhecidas como atrófica e hipertrófica ou hiperplásica. As formas crônicas atróficas são subdivididas em estomatite associada à prótese e queilite angular e, as formas hiperplásicas em candidíase bucal crônica, candidíase leucoplásica, candidíase relacionada a endocrinopatias, candidíase cutâneo-mucosa localizada e candidíase crônica difusa (REGEZI & SCIUBBA, 2000; NETO *et al.*, 2005).

Todas as formas crônicas hiperplásicas podem manifestar-se isoladamente na boca, principalmente em indivíduos adultos, ou podem aparecer em localização mucocutânea, especialmente em crianças e associada a condições sistêmicas. Na candidíase crônica, a mucosa apresenta-se eritematosa ou como uma placa branca firmemente aderida. A candidíase ainda pode apresentar formas mucocutâneas do tipo localizada, aparecendo em regiões como: boca, face, couro cabeludo, unhas e regiões de dobras da pele. Pode ser do tipo familiar e do tipo associada a síndromes. A doença poderá levar o paciente ao estado de septicemia podendo, então, ser fatal. A forma disseminada da candidíase é rara, e ocorre em pacientes terminais com doenças debilitantes, neoplásicas, doenças imunossupressoras e após transplantes de órgãos. Nesses casos, pode acometer diferentes órgãos e tecidos como: pulmões, meninges, rins, bexiga, articulações, fígado, coração e olhos (REGEZI & SCIUBBA, 2000; GOMPERTZ *et al.*, 2008; NETO *et al.*, 2005; PEREIRA-CENCI, 2008; TAVARES, 2009; PEIXOTO *et al.*, 2014).

As manifestações clínicas da candidíase podem ser destacadas da seguinte forma:

- candidíase orofaríngea

A *Candida albicans* é um microrganismo presente na flora normal da região orofaríngea. Sua transformação de microrganismo comensal para patógeno está relacionada a fatores locais e sistêmicos. É particularmente provável que ocorra no diabético, em gestantes e em pessoas obesas. Antibióticos sistêmicos, corticoides orais e inalatórios e agentes contraceptivos orais podem contribuir para o

desencadeamento das lesões. A candidíase também pode ser causada pela disfunção das células T, principalmente em pacientes com infecção por HIV. As manifestações orofaríngeas da candidíase podem ser agudas ou crônicas. A candidíase aguda apresenta as formas: pseudomembranosa e eritematosa; a forma crônica da doença é conhecida como atrófica (PEIXOTO *et al.*, 2014; BERGUER, 2013).

- candidíase pseudomembranosa

É a forma mais comum e se manifesta por placas ou nódulos branco-amarelados, de consistência mole à gelatinosa, na mucosa bucal, no palato, na orofaringe ou na língua, que são facilmente removidas, revelando uma mucosa eritematosa e não ulcerada sob as placas (Figura 1). Na maioria dos casos, essa forma da doença apresenta lesões assintomáticas, a não ser nos casos mais graves onde os pacientes queixam-se de sensibilidade, ardência e disfagia (PEIXOTO *et al.*, 2014).

Figura 1. Candidíase pseudomembranosa.



Fonte. <http://jmarcosrs.files.wordpress.com/2012/03/candidiaseoral4.jpg>

- candidíase eritematosa

Pode ocorrer independente ou simultaneamente à forma pseudomembranosa. Trata-se de uma lesão sintomática (Figura 2), cuja sensibilidade é intensa devido às numerosas erosões dispersas pela mucosa e à inflamação presente, com localização preferencial ao longo do dorso da língua. Na maior parte dos casos as lesões evoluem de maneira assintomática, podendo somente causar ardência mediante a ingestão de alimentos ácidos ou quentes. É a forma clínica mais frequente entre pacientes não infectados pelo HIV (BERGUER, 2013; PEIXOTO *et al.*, 2014).

Figura 2. Candidíase eritematosa



Fonte: http://cac-php.unioeste.br/projetos/patologia/lesoes_fundamentais/mancha

- candidíase atrófica crônica

Conhecida como “estomatite por dentadura” (Figura 3) ocorre frequentemente em pessoas que usam próteses totais superiores. Clinicamente, apresenta-se com uma superfície vermelha viva, de aveludada a pedregosa, de forma circunscrita ou difusa e podendo ser ulcerada ou não, palato hiperemiado e doloroso. Os sintomas clínicos mais comuns são: dor, irritação e distúrbios da salivação, entretanto, muitos pacientes são assintomáticos (BERGUER, 2013; PEIXOTO *et al.*, 2014).

Figura 3. Candidíase atrófica crônica



Fonte: <http://candidiase.org/candidiase-oral/>

2.7 - Estomatite por prótese

A estomatite por prótese consiste em uma condição patológica caracterizada por um processo inflamatório que acomete a mucosa oral e afeta cerca de dois terços dos usuários, a maioria mulheres e idosos. São observadas alterações teciduais, especialmente na presença de próteses superiores, entre as quais se encontram as lesões no palato e alterações nos tecidos moles, acompanhadas ou não de outras manifestações inflamatórias (queilite angular e glossite). Além do mais, alguns pacientes apresentam-se assintomáticos para a infecção, entretanto, normalmente relatam uma diversidade de sintomas, como dor, inchaço, xerostomia, halitose e sangramento, sintomas que muitas vezes impossibilitam o uso da prótese. Os sintomas citados acima geralmente são relatados com mais frequência em pacientes usuários de próteses totais, em detrimento dos usuários de próteses parciais (D'AVILA, 2006; GUSMÃO, 2007; OLIVEIRA, 2009; VASCONCELOS *et al.*, 2010; MELO, GUERRA, 2014)

2.8 - Candidemia (Infecções disseminadas)

É a manifestação mais comum de infecção disseminada por *Candida* sendo a mortalidade de 40% a 60% atribuída direta ou indiretamente à candidemia e as espécies mais comumente isoladas, a *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*. O principal mecanismo de transmissão da candidemia é por via endógena, em que espécies de *Candida* que constituem a microbiota de vários sítios anatômicos e sob condições de debilidade do hospedeiro, comportam-se como patógenos oportunistas. Outro mecanismo para transmissão é por via exógena, por meio das mãos de profissionais da saúde que cuidam dos pacientes, materiais médico-hospitalares, como cateteres e soluções intravenosas que estejam contaminadas por fungos (GIOLO, SVIDZINSKI, 2010).

Dentre os fatores de risco ligados ao hospedeiro, destacam-se: uso de antibióticos de largo espectro, tempo prolongado de internação hospitalar, neutropenia, nutrição parental, sonda vesical, ventilação mecânica, cateter venoso central e colonização de vários sítios anatômicos por leveduras. Além desses fatores, outros merecem ser destacados, como idade extrema, imunossupressão, insuficiência renal, diabetes, quimioterapia, radioterapia, lesão de mucosas, hemodiálise, cirurgia prévia e corticoterapia (PEIXOTO *et al.*, 2014).

Os pacientes podem apresentar choque séptico e disseminação para múltiplos órgãos sem positividade em hemoculturas. O quadro clínico da candidíase disseminada é indistinguível daquele apresentado na infecção bacteriana. O quadro histológico caracteriza-se por múltiplos micro abscessos em diversos órgãos. Olhos, rins, fígado, baço e cérebro são os locais mais comumente acometidos, mas pode atingir quase todos os órgãos. Os eventos que sugerem o diagnóstico de candidemia incluem o surgimento de lesões cutâneas e retinianas. As lesões cutâneas são indolores e não pruriginosas, papulares e pustulares e cercadas por uma área de eritema. As lesões oculares manifestam-se como exsudatos brancos característicos na retina; com a extensão do processo ao humor vítreo, a retina torna-se escurecida. A disseminação hematogênica das diversas espécies de *Candida* pode afetar outros sítios. A endocardite é uma complicação não muito frequente e que pode levar à morte, em especial, em usuários de drogas injetáveis, além daqueles pacientes com próteses valvares cardíacas e com cateteres venosos centrais. Formas de infecções focais invasivas mais comuns são no trato urinário, osteoarticulares, endoftalmite, peritonite e meningite. Elas resultam da inoculação local ou disseminação tanto por contiguidade como hematogênica (PEIXOTO *et al.*, 2014).

2.9 – Características microscópicas

As áreas afetadas apresentam epitélio acantótico e as camadas superficiais, frequentemente, edemaciadas além de infiltrado inflamatório crônico no cório. As pseudomembranas são formadas por fungos, resíduos ceratóticos, células inflamatórias, células epiteliais descamadas, bactérias e fibrina. As lesões pseudomembranosas da candidíase, quando submetidas ao exame microscópico, indicam a presença de uma reação inflamatória superficial localizada, com erosão ou ulceração de superfície. A existência de fungos se limita às camadas da superfície do epitélio nas infecções menos agressivas, já nas condições mais graves, as hifas se estendem às porções mais profundas do epitélio. Pode haver ainda a presença de células da levedura e de hifas ou micélios nas camadas superficial e profunda do epitélio de uma lesão de candidíase. Nas infecções superficiais, pode-se observar a infiltração de neutrófilos no epitélio e formação de micro abscessos. A hiperplasia epitelial é um achado comum das formas crônicas da candidíase. Em exame citológico de uma candidíase gengival ocorre a presença de hifas, micélios e

esporos, características estas, compatível com a infecção fúngica (NETO *et al.*, 2005).

2.10 - Diagnóstico

O diagnóstico da candidíase bucal pode ser realizado através de dados clínicos e de exames laboratoriais. Para que se alcance o isolamento e identificação do patógeno é importante que o tipo e a qualidade da amostra biológica, submetida ao laboratório de micologia, seja de boa qualidade. A assepsia antes da coleta e a quantidade da amostra são fatores primordiais para o sucesso do diagnóstico fúngico por leveduras do gênero *Candida*. Procedimentos para a coleta de amostras são estabelecidos de acordo com a manifestação clínica, como pedaços de pele e unhas, raspados de mucosa oral, vaginal ou anal, secreção do trato respiratório, sangue, líquor, urina, fezes, dentre outros (PEIXOTO *et al.*, 2014).

Em grande parte dos casos o exame clínico permite que se faça o diagnóstico da candidíase mucocutânea, sendo a necessidade de cultura pouco comum. Por meio da escarificação das lesões e aplicação de uma preparação de hidróxido de potássio (KOH) ou coloração de Gram pode-se confirmar o diagnóstico identificando-se leveduras em brotamento ou pseudo-hifas. Se a patologia for recorrente ou resistente ao tratamento prévio, deve-se pedir a cultura para identificar se o agente é uma espécie mais resistente, como a *C. glabrata* ou a *C. krusei*. A endoscopia digestiva alta é reservada para suspeita de esofagite e caso apareça lesões em forma de placas ou ulcerações, a biópsia comprovará invasão da mucosa com leveduras em brotamento e pseudo-hifas. Quanto à candidíase vulvovaginal, o diagnóstico é clínico, sendo o exame de alta confiança para a identificação da patologia, apresentando ótima correlação com a cultura positiva para a *Candida*. Entretanto, apenas a cultura positiva não confirma, necessariamente, a candidíase vulvovaginal (BOATTO *et al.*, 2007; ZIMMERMANN, *et al.*, 2009; PEIXOTO *et al.*, 2014).

Definir corretamente o diagnóstico da candidíase disseminada é um dos pontos de maior importância para o sucesso terapêutico. O diagnóstico clínico não é definitivo e satisfatório, pois os sinais e sintomas não são tão específicos. Febre e leucocitose seriam os principais achados que indicam a infecção fúngica, porém apenas 80% dos pacientes apresentam hipertermia e em 50% dos pacientes a leucocitose não se apresenta. Além disso, a apresentação clínica de uma

candidemia é muitas vezes igual à apresentação de uma bacteremia. A comprovação de uma disseminação geralmente é encontrada em hemocultura ou em outros lugares estéreis do corpo. Os cateteres vasculares podem ser o local de entrada da *Candida* spp. para a corrente sanguínea. Dessa forma, quando retirados deve ser feita a cultura da ponta distal do mesmo, pela técnica de rolamento. Alguns estudiosos consideram que o isolamento de *Candida* spp. seja sempre abordado como infecção sistêmica. Todavia, não há ainda um teste diagnóstico eficiente que diferencie os pacientes com semeadura inconsequente do sangue, daqueles cujas hemoculturas positivas representam disseminação hematogênica para diversos órgãos. Para os pacientes mais graves com suspeita de candidíase, o surgimento de lesões cutâneas pustulares ou lesões retinianas típicas pode fortalecer essa hipótese (PEIXOTO *et al.*, 2014).

No diagnóstico da candidíase são relevantes os aspectos clínicos, microscópicos e microbiológicos. Entretanto a biópsia, geralmente, não é necessária para o diagnóstico da candidíase bucal, exceto nas situações envolvendo uma possível malignização. O diagnóstico está associado à demonstração de hifas da *Candida* nos esfregaços ou na superfície da prótese, e pode ser confirmado pela resposta positiva à aplicação tópica de antifúngicos. O diagnóstico diferencial deve ser realizado em relação às leucoplasias, líquen plano e grânulos de Fordyce. A literatura também destaca as escaras associadas às queimaduras químicas, ulcerações traumáticas, placas mucosas da sífilis, lesões ceratóticas e lúpus eritematoso discóide. Queimaduras térmicas e reações por medicamentos devem ser distinguidas de lesões vermelhas que algumas vezes aparecem isoladas da candidíase atrófica. Os casos precoces ou de baixa gravidade do eritema multiforme também devem ser incluídos (REGEZI & SCIUBBA, 2000; NETO *et al.*, 2005; GOMPERTZ *et al.*, 2008).

2.11 - Tratamento

A alcalinização do pH bucal e uso de medicamentos antifúngicos são condutas efetivas adotadas no tratamento e controle da candidíase sendo a droga mais usada a Nistatina. As opções terapêuticas efetivas para o tratamento da *Candida* podem ser compostas por quatro grupos de drogas (MANGUEIRA *et al.*, 2010) demonstrados na figura 4.

Figura 4. Grupos de medicamentos para tratamento de candidíase (PEIXOTO *ET al.*, 2014).

Grupo	Poliênicos	Triazólicos	Equinocandinas	Fluocitosina
Exemplos	Nistatina Anfotericina B	Fluconazol Itraconazol Voriconazol Posaconazol	Casprofugina Micafungina Anidulafungina	

Fonte: Adaptado de WILLIANS, KURIYAMA, SILVA, MALIC, LEWIS, 2011.

Figura 5. Medicamentos indicados para o tratamento das infecções por *Candida albicans* (PEIXOTO *ET al.*, 2014).

	Nome	Formulação	Dose	Duração tratamento
Adm tópica	Nistatina	Pastilha – 100.000UI	Pastilha – 100.000UI, 4 vezes/dia –dissolver na boca lentamente	7-14 dias
		Suspensão Oral – 100.000UI/ml	Suspensão Oral – 500.000UI (5ml na concentração de 100.000U/ml), 4 vezes/dia. Bochechar por algum tempo e depois deglutir	7-14 dias
	Clotrimazol	Pastilha 10mg	1 pastilha de 10mg dissolvidos na boca, 5 vezes/dia	7-14 dias
	Anfotericina	Pastilha 10mg	Pastilha 10mg, 4 vezes/dia	10-15 dias
Adm sistêmica	Fluconazol	Comprimido oral 100mg	1 comprimido de 100 mg/dia	7-14 dias
	Cetoconazol	Comprimido oral 200-400mg	1 comprimido de 200mg-400mg/dia em jejum	7-14 dias

Fonte: Adaptado de WILLIANS, KURIYAMA, SILVA, MALIC, LEWIS, 2011.

Os medicamentos de escolha para o tratamento das infecções por *Candida albicans* são os antifúngicos como a Nistatina sob a forma de suspensão, aplicada topicamente sobre a lesão (Regezi & Sciubba, 2000) ou ainda sob a forma de comprimidos e pomadas. O Cetoconazol está recomendado principalmente para

lesões crônicas e disseminadas. O creme de Nistatina é utilizado nos casos de estomatite por dentadura, aplicado no tecido e também na própria prótese, a fim de proporcionar contato prolongado e eliminar os microrganismos da base da dentadura (REGEZI & SCIUBBA, 2000; TOMMASI, 2000). A suspensão oral de Nistatina, quando mantida em contato com a lesão bucal, pode ser utilizada inclusive no tratamento dos casos crônicos e graves da doença, conseguindo-se bons resultados clínicos. Este medicamento deve ser administrado em doses de 200.000 a 400.000 unidades, utilizado três a quatro vezes ao dia, com instrução para bochechar e deglutir. Já a Nistatina em suspensão (1.000.000 U/ml) para bochechos e gargarejos, na dosagem de 5mL, quatro vezes ao dia. Comprimidos de Nistatina com 500.000 U dissolvidos na boca, por pelo menos quatro vezes ao dia, produzem excelentes resultados. Outro medicamento comumente utilizado é o Clotrimazol sob a forma de pastilha oral ou comprimidos de 10mg, administrados durante 14 dias, cinco vezes ao dia sendo que o uso continuado da Nistatina e do Clotrimazol deve ser mantido por aproximadamente uma semana após o desaparecimento dos caracteres clínicos da doença. O Cetoconazol é prescrito via oral para ser ingerido durante a refeição, pois os ácidos gástricos são essenciais para sua dissolução e absorção. A dose diária recomendada para os pacientes aidéticos é de 400mg/dia. Podem ocorrer efeitos adversos, tais como: náuseas, pruridos, erupções cutâneas e hepatotoxicidade (REGEZI & SCIUBBA, 2000; TOMMASI, 2000).

Outros medicamentos também são indicados como o Fluconazol e o Itraconazol. Os efeitos tóxicos destes medicamentos não são comuns, mas a interação medicamentosa pode dificultar o sucesso do tratamento e a recidiva da candidíase é frequentemente observada quando do uso desses medicamentos. Os casos sistêmicos graves são tratados com Anfotericina-B, receitado pelo médico e administrado em nível hospitalar, pois o medicamento requer administração intravenosa e é altamente nefrotóxico. Para, a administração de medicamentos como a Anfotericina-B e, o Cetoconazol e a Flucitosina pode ser necessária nos casos de candidíase mucocutânea crônica ou de candidíase bucal associada à imunossupressão, onde os agentes tópicos, por vezes, não são eficazes. Nesses casos a administração exige cautela, pois o Cetoconazol e a Flucitosina podem ser hepatotóxicos e, conseqüentemente, inibir a hematopoese (REGEZI & SCIUBBA, 2000; TOMMASI, 2000).

A terapêutica antifúngica também se revela eficiente nos pacientes imunossuprimidos, distinguindo-se somente num maior tempo de duração do tratamento. Para os casos não controlados pelo tratamento tópico exclusivo, é necessária a terapêutica com antimicóticos sistêmicos. A Nistatina deve ser o fármaco de primeira escolha, considerando sua eficácia, ausência de efeitos colaterais graves (via oral) e custo reduzido quando comparado com outras drogas. Se a lesão persistir por, aproximadamente, mais de 15 dias e ainda haja dúvidas quanto à definição do diagnóstico, recomenda-se a biópsia. Se confirmada a presença de hifas, estão indicados medicamentos mais eficazes e de custo mais elevado (derivados azólicos: cetoconazol, fluconazol e itraconazol) (NETO *et al.*, 2005).

Os casos sistêmicos graves, como a meningite, o tratamento consiste na prescrição de Anfotericina-B, receitado pelo médico e administrado em nível hospitalar, pois o medicamento é por via intravenosa e com altos níveis de nefrotoxicidade (BERGER, 2013; SHELBUNE, 2013).

2.12 - O papel da saliva

A saliva é um fluido de composição complexa e propriedades funcionais bem definidas: auxilia a digestão, mantém a lubrificação e integridade da cavidade oral e regula o pH do meio bucal em torno de por meio de tampões salivares, protege contra infecções fúngicas e bacterianas. A xerostomia ou boca seca atinge boa parte dos usuários de próteses. Esta situação pode ser agravada pela utilização de fármacos, alimentos e bebidas que favorecem a hipossalivação. Entre os fármacos que aumentam esse risco, há os inibidores da enzima conversora de angiotensina, anti-histamínicos, anticolinérgicos e diuréticos. Bebidas contendo cafeína, consumo excessivo de álcool e açúcar, também estão relacionadas ao agravamento da xerostomia (HOLANDA, 2007; ELGUEZABAL *et al.*, 2008; OLIVEIRA, 2009; ACEVEDO, 2010).

A diminuição do fluxo salivar, em casos de xerostomia ou disfunção na produção de saliva, aumenta a possibilidade de trauma mecânico e diminui o efeito protetor da imunoglobulina A (IgA) presente no fluido, o que favorece índices elevados de colonização por *Candida* spp. (TORRES *et al.*, 2007; PEREIRA-CENCI, 2008; OLIVEIRA, 2009; VASCONCELOS, *et al.*, 2010).

Após a higiene bucal, todas as superfícies da cavidade oral são recobertas por uma película salivar, tornando propícia a colonização pelos microrganismos que irão iniciar o processo de formação dos biofilmes. Em seguida, se as condições forem favoráveis, os colonizadores tardios irão se fixar, dando início aos biofilmes de *Candida* spp. (PEREIRA- CENCI *et al.*, 2008).

Na saliva existem moléculas responsáveis por impedir a adesão dos fungos à prótese e moléculas que, por outro lado, colaboram para que essa adesão ocorra. As primeiras compreendem: lisozima, lactoferrina, histatinas, peroxidases, calprotectina e IgA salivar, e as outras, responsáveis pela adesão, são: mucinas, statherinas e proteínas ricas em prolina (TORRES *et al.*, 2007; ELGUEZABAL *et al.*, 2008; PEREIRA-CENCI, 2008; OLIVEIRA, 2009 NETT *et al.*, 2010).

A película salivar tem função relevante na aderência e formação do biofilme, o que favorece a cárie, mas seu papel na colonização de próteses dentárias é controverso. Normalmente, a região sob a prótese dentária é a região mais ácida da cavidade oral, o que favorece o aparecimento de lesões, além do que contribui para a inativação do poder protetor da IgA salivar. Esta tem sua ação máxima na faixa de pH entre 5,9 e 7,5; em pH muito ácido ou alcalino sua ação fica comprometida ou mesmo ausente. Devido as diferentes fases morfológicas que o fungo pode assumir, a ação protetora da saliva pode ficar comprometida (ELGUEZABAL *et al.*, 2008; PEREIRA-CENCI, 2008).

2.13 - Biofilmes

A cavidade oral representa um ecossistema de relativa diversidade de nichos ecológicos, o que permite a colonização da mucosa por uma comunidade microbiana altamente diversa. Todas as superfícies da boca apresentam uma microbiota aderida, onde os microrganismos podem estar livres, mas preferencialmente se organizam em estruturas complexas denominadas biofilmes (APARNA, YADAV, 2008; VASCONCELOS *et al.*, 2010; ANDRÉ *et al.*, 2011).

O biofilme é um sistema organizado composto por microrganismos unicelulares que formam uma estrutura multicelular, a qual garante a sobrevivência coletiva dos mesmos. Acumula-se nas superfícies dos dentes e próteses como uma película envolta por uma matriz extracelular, proveniente tanto do hospedeiro quanto dos microrganismos. Logo após a escovação, forma-se uma película salivar composta por glicoproteínas (mucinas e lisozimas) que favorecem a adesão sobre a

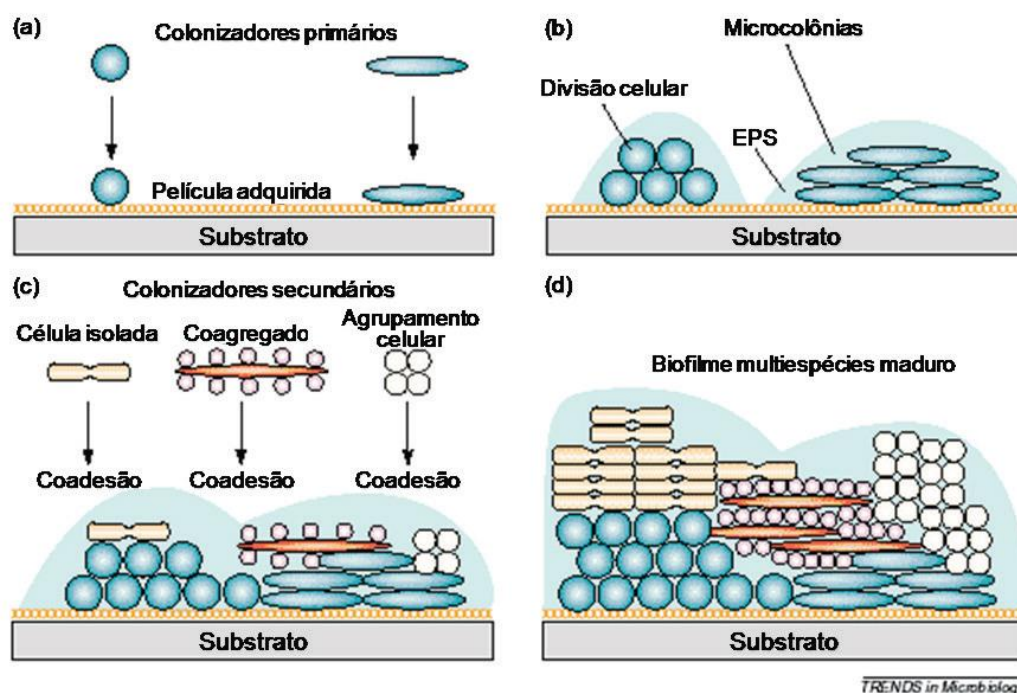
mucosa oral. Assim, os microrganismos pioneiros (principalmente *Streptococcus mutans*) se instalam, formando micro colônias que irão abrigar novas espécies, aumentando a diversidade microbiana do biofilme (BARBIERI *et al.*, 2007; PEREIRA-CENCI, 2008; OLIVEIRA, 2009; NETT *et al.*, 2010).

A capacidade de formar biofilmes multiespécies é uma vantagem adaptativa observada em fungos do gênero *Candida* que habitam a mucosa oral. O biofilme garante a sobrevivência dos microrganismos devido à sua estrutura e às características das espécies envolvidas, conferindo resistência aos agentes antimicrobianos, limpeza mecânica e defesas naturais do hospedeiro (APARNA, YADAV, 2008; PEREIRA-CENCI, 2008; OLIVEIRA, 2009; NETT *et al.*, 2010).

É interessante frisar ainda que durante a formação do biofilme, há a incorporação de componentes celulares do hospedeiro, como a queratina proveniente da descamação de células epiteliais, e os neutrófilos, resultantes da infiltração no tecido infectado. Os neutrófilos estão presentes com a finalidade de conferir proteção, mas também podem ser incorporados ao biofilme (DONGARI-BAGTZOGLOU *et al.*, 2009)

Segundo Derengowski (2011), vários autores têm buscado modelos que expliquem de forma clara e sucinta as etapas de formação dos biofilmes. A figura 4 ilustrada mostra uma descrição simplificada da constituição desses sistemas. É importante dizer que além das etapas mostradas na figura 4, há ainda a fase que corresponde à dispersão celular dos agregados do biofilme; esses microrganismos irão colonizar outros nichos ou participar da formação de novos biofilmes.

Figura 6. Etapas da formação de um biofilme multiespécie. Em (a) a matriz de polissacarídeo extracelular (EPS); (c) co-adesão de células individuais, células ou grupos de células idênticas para formar o biofilme jovem multiespécie e (d) a maturação do biofilme multiespécies.



Fonte: MELO, GUERRA, 2014.

2.14. Interação entre fungos e bactérias na formação do biofilme e o mecanismo de *quorum sensing*

Entre as bactérias normalmente relacionadas à formação dos biofilmes, podemos destacar o gênero *Streptococcus*, cocos gram-positivos, especialmente *S. mutans*. Outras espécies encontradas nessa estrutura são: *Lactobacillus* spp. *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Supõe-se que a estrutura organizada dos biofilmes seja regulada por um mecanismo chamado *quorum sensing*, mediado pela densidade celular e atividade de moléculas auto indutoras. Esse artifício permite aos organismos unicelulares se comportarem como um único ser multicelular, favorecendo a resistência aos compostos antimicrobianos, mecanismos de defesa do hospedeiro e expressão de fatores de patogenicidade, ou seja, confere maior capacidade de adaptação ao meio (BARBIERI *et al.*, 2007; APARNA, YADAV, 2008; PEREIRA-CENCI, 2008; NETT *et al.*, 2010; VASCONCELOS *et al.*, 2010; ANDRÉ *et al.*, 2011; SALERNO *et al.*, 2011).

Caracterizando melhor, *quorum sensing* é um mecanismo de regulação da expressão gênica em resposta à variação da densidade celular em um biofilme

multiespécie, onde a produção de moléculas auto indutoras se intensifica em função do aumento da população microbiana, gerando, assim, sinais químicos que permitem a “comunicação” entre os microrganismos (PEREIRA-CENCI, 2008).

Segundo Vasconcelos *et al.* (2010), a interação entre *C. albicans* e *Streptococcus* spp. favorece a colonização pelo fungo. *Streptococcus mutans*, um membro comumente encontrado em próteses de acrílico, pode competir com *C. albicans* pelos sítios anatômicos, como também propiciar sua colonização. Contudo, a colaboração entre eles pode ser entendida como uma relação mutualística, visto que ambos são favorecidos pela co-adesão. Essa complexa interação levedura-bactéria é intermediada tanto por mecanismos internos ao biofilme quanto externos; entre eles estão: higiene da prótese e fluxo salivar do usuário.

2.15. Materiais e Higiene da Prótese

A capacidade que os fungos têm de crescer sobre os materiais da prótese já é bem conhecida; pouco se conhece, porém, a respeito de quais propriedades do substrato colaboram para isso. Algumas propriedades podem estar relacionadas com a energia livre de superfície, hidrofobicidade, rugosidade da prótese, pH ácido, higiene da mucosa oral e da prótese, tempo de uso e estado de conservação da mesma (PEREIRA-CENCI, 2008).

O conceito de energia livre de superfície indica a facilidade com a qual a saliva se espalha por uma superfície. Assim, quanto maior a área, maior será a energia livre de superfície e, por sua vez, regula a capacidade de molhamento e direciona a formação da película salivar sobre o acrílico utilizado na confecção das próteses. Com isso, é necessário conhecer como os fungos interagem com as superfícies, entender como funciona a velocidade de crescimento e as necessidades nutricionais. Segundo Douglas (2002), biofilmes de espécies não-*albicans*, crescem melhor em meio contendo glicose. Tais informações são vitais para o desenvolvimento de estratégias que previnam essas interações (MELO, GUERRA, 2014).

A hidrofobicidade do substrato em que o fungo se fixa é considerado um fator inespecífico na adesão inicial; no entanto, quanto mais hidrofóbica for a superfície, maior será a aderência celular esperada (PEREDA, 2007; MELO, GUERRA, 2014).

A rugosidade, medida importante a ser considerada, é a média dos desvios entre vales e picos em uma superfície. Quanto maior a sua rugosidade, mais

propensa ela será à formação de biofilmes. Essa característica está intimamente relacionada ao material da prótese e tempo de uso, tanto é que, próteses antigas e confeccionadas em material áspero, dificultam a limpeza e a remoção mecânica do biofilme (APARNA, YADAV, 2008; PEREIRA-CENCI, 2008).

Dentre os fatores que colaboram para a manifestação da estomatite por prótese, a higiene é uma das poucas variáveis cuja participação do usuário pode interferir positivamente. Os principais problemas associados ao uso incorreto de próteses ocorrem quando o usuário não recebe orientação adequada sobre o processo de higienização, pois além da prótese, a higiene da mucosa e da língua deve ser realizada diariamente. Outros fatores como a dificuldade ou limitação de movimentos dos membros superiores em idosos e a falta de produtos específicos no mercado pode prejudicar a higienização. Entre os usuários de prótese, os idosos são os mais prejudicados em relação à informação sobre os procedimentos corretos, além de alguns utilizarem escova não dentária (SILVA, 2011; MELO, GUERRA, 2014).

Padrões salivares e medidas presuntivas de higiene podem ser utilizados pelos profissionais na avaliação clínica do paciente usuário de prótese, com ou sem a infecção. Outras medidas, como as que avaliam a qualidade do material, seu estado de conservação e o grau de higienização, direcionam o olhar para os pacientes propensos a apresentarem a patologia ou para aqueles com diagnóstico já confirmado, auxiliando no tratamento e prevenindo recidivas. O usuário de uma prótese considerada má higienizada, deve receber esclarecimentos sobre os produtos e técnicas ideais para a limpeza, ou mesmo ser aconselhado a substituí-la. Muitos, inclusive, têm a ideia errônea de que sendo as próteses permanentes, não necessitam de manutenção e acompanhamento especializado (BARBIERI *et al.*, 2007; TAVARES, 2009; NETT *et al.*, 2010).

2.16. Prognóstico

A candidíase aguda e grande parte das formas crônicas possuem prognóstico excelente. As lesões geralmente desaparecem em uma ou duas semanas após o início do tratamento sendo que em alguns casos crônicos há a necessidade de um tratamento mais prolongado. Porém, para as formas sistêmicas disseminadas o prognóstico é reservado. A importância desta infecção está associada ao fato da patologia produzir hiperplasia epitelial e também poder originar a leucoplasia bucal.

Apesar de não ser comprovado que a candidíase crônica seja uma condição cancerizável, a invasão do epitélio pela *Candida albicans* e a sua posterior proliferação, podem contribuir para a alteração neoplásica (NETO *et al.*, 2005; MELO, GUERRA, 2014).

2.17. Prevenção

Os pacientes portadores de prótese total ou removível dento-muco-suportada devem realizar a remoção mecânica e ou química dos fungos retidos nas irregularidades e depressões dos aparelhos protéticos já que a presença da *Candida albicans* na superfície da prótese em contato com a mucosa é o fator determinante para o aparecimento da estomatite por dentadura. A remoção mecânica pode ser feita através da escovação com escovas especiais para higienização de próteses ou com escovas convencionais macias com sabão neutro além da higienização da mucosa oral. A remoção química geralmente é feita deixando-se a peça protética, durante toda a noite, mergulhada em solução apropriada. Existem inúmeras soluções que podem ser utilizadas para a remoção de manchas e depósitos orgânicos e inorgânicos das superfícies das próteses, mas a solução de custo mais baixo e fácil preparo pelo paciente é a diluição de 15 ml de hipoclorito de sódio com concentração entre 2 e 3 % (água sanitária) em um copo (300ml) de água (MELO, GUERRA, 2014).

2.18. PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas medicinais apresenta relatos desde a antiguidade, e a população atual utiliza como terapias no tratamento de doenças sendo esta, uma prática bem comum e as primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem remontam às sagradas escrituras. Muitas plantas apresentam atividade biológica benéfica ao ser humano e o grande desafio do último século tem sido desvendar e validar cientificamente espécies vegetais com potencial clínico como a *Papaver somniferum* na obtenção da morfina além de vencer as dificuldades da legislação brasileira em relação aos estudos com plantas medicinais (BONOMINI, 2013; FERREIRA *et al.*, 2014; DUTRA *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2016).

As plantas e seus extratos estão em todo lugar, inclusive em produtos lácteos, como o ginkgo biloba e a verbena, na alimentação natural, entre os medicamentos que eram utilizados há tempos e os que hoje são utilizados, os produtos naturais e

seus extratos cada vez mais ganham espaço no mercado consumidor. Levando em consideração os milhares de fitoconstituintes encontrados em uma planta, o processo de separação e isolamento pode ser longo e possuir várias etapas. Em geral, esse processo combina diversas técnicas de separação, que dependem da solubilidade, volatilidade e estabilidade dos compostos a serem separados. Esse interesse crescente dos produtos naturais fez expandir e modificar o arsenal de métodos de extração tradicionais. A extração consiste em uma das primeiras etapas para separação e obtenção das substâncias farmacológicas de uma espécie vegetal (COUTO *et al.*, 2010).

Entre as espécies vegetais que despertam grande interesse pode ser relatado as do gênero *Allamanda*, que pertencem à família Apocynaceae em que já se obtiveram extratos com atividades biológicas fungicidas, bactericidas, antileucêmicas. Assim é importante que se desperte maior interesse nas pesquisas voltadas para a utilização de plantas como fontes de recursos e produtos no combate as enfermidades que acometem o homem (BONOMINI, 2013).

Dada a incidência de doenças orais, o aumento da resistência a bactérias por antibióticos, os efeitos adversos de alguns agentes antibacterianos atualmente utilizados em odontologia e considerações financeiras nos países em desenvolvimento, há necessidade de prevenção e opções de tratamento não convencionais, seguras, eficazes e econômicas. Embora vários agentes estejam comercialmente disponíveis, estes compostos podem alterar a microbiota oral e têm efeitos adversos indesejáveis, tais como vômitos, diarreia e coloração dentária. Por isso, a busca por produtos alternativos continua e os fitoquímicos naturais isolados das plantas utilizadas como medicamentos tradicionais são considerados como boas alternativas (SINGH *et al.*, 2016).

2.18.1. Plantas com potencial terapêutico

As plantas medicinais são fontes importantes de substâncias biologicamente ativas, servindo de base para pesquisa farmacológica e descoberta de novas moléculas com atividade terapêutica. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de oitenta por cento da população de países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para sua atenção primária utilizando as plantas medicinais como única fonte de cuidados básicos de saúde (KINGSTON, 2011; PRABHADEVI *et al.*, 2012; SIMONETTI *et al.*, 2016).

Muitas plantas medicinais possuem componentes complexos e os efeitos terapêuticos podem ser resultado de uma ação sinérgica e/ou supressiva. Também há a preocupação de inconsistência com a composição do extrato vegetal e contaminação ocasional por adulterantes e componentes tóxicos. O controle de qualidade visa assegurar a consistência, segurança e eficácia da droga vegetal, criando uma correlação entre os componentes e sua ação. A qualidade de medicamento à base de plantas medicinais pode ser afetada por muitos fatores, incluindo as mudanças de estação, tempo de colheita, locais de cultivo, processamento pós-colheita, adulterantes e procedimentos de extração e preparação. Da colheita até o produto final os marcadores químicos desempenham um papel fundamental na avaliação da qualidade dos medicamentos fitoterápicos além de serem aplicáveis na autenticação de espécies vegetais, aperfeiçoar métodos de extração e purificação, elucidação da estrutura e determinação da pureza auxiliando ainda na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. A Agência Europeia de Medicamentos (EMA) define marcadores químicos como constituintes quimicamente definidos ou grupo de constituintes de um produto a base de plantas medicinais que são de interesse para fins de controle de qualidade independentemente se eles possuem alguma atividade terapêutica. A quantidade de um marcador químico pode ser um indicador da qualidade de um medicamento a base de plantas farmacológica (LIU *et al.*, 2010).

O Brasil é signatário da Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB), acordo estabelecido pela Organização das Nações Unidas (ONU) e integrado por 188 países cujos objetivos estão estabelecidos na conservação da diversidade biológica, utilização sustentável de seus componentes, repartição justa e equitativa dos benefícios derivados da utilização dos recursos genéticos além da importância dos conhecimentos de povos indígenas e de comunidades locais para o alcance destes objetivos. O Brasil possui entre quinze a vinte por cento da biodiversidade mundial, sendo setenta e cinco por cento das espécies brasileiras localizadas na Floresta tropical Atlântica e Floresta Amazônica, tornando o Brasil uma fonte importante na obtenção de novos produtos farmacológicos (BONOMINI, 2013).

2.18.2. Bioma Amazônia

Desde o Brasil Colônia, os europeus, em especial os jesuítas, obtinham o conhecimento sobre plantas medicinais a partir da experiência dos habitantes locais

quanto ao emprego no tratamento de determinadas moléstias. Com o avanço da botânica e farmacognosia, essas plantas ganharam descrição e nomes, tiveram seus componentes químicos identificados, assim como foram realizados estudos sobre as ações farmacológicas no corpo humano. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem para a divulgação das propriedades terapêuticas dos vegetais utilizados pelos efeitos medicinais, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos, mas tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos. A pesquisa de medicamentos de origem vegetal constitui um mercado poderoso à busca de novas moléculas para assegurar a competitividade na produção de novos medicamentos patenteados, além da oportunidade para participar da categoria dos medicamentos fitoterápico (DA SILVA *et al.*, 2013).

A flora amazônica é considerada a maior reserva de plantas medicinais do mundo, no entanto ainda é pequeno o número de plantas cientificamente estudado do ponto de vista químico e farmacológico. É nessa floresta amazônica que pode ser encontrada a espécie *Libidibia ferrea*, conhecida popularmente como jucaina, jucá, pau-ferro-verdadeiro e birá-obi. Nos sertões do Norte e Nordeste do Brasil, principalmente em Pernambuco e no Ceará, esta espécie também pode ser encontrada, sendo utilizada em forma de chá, xarope e tintura, por apresentar atividade analgésica, anti-inflamatória, antiulcerogênica e antibacteriana (MARREIRO *et al.*, 2014).

O espaço para os medicamentos de origem vegetal tem ganhado espaço na indústria farmacêutica, uma vez que há a escassez de entidades químicas inovadoras mesmo com os altos custos empregados em pesquisa e desenvolvimento. Os produtos naturais, tradicionalmente têm sido a maior fonte de novos fármacos, que se consagraram como medicamentos industrializados a partir de sínteses para reproduzir as moléculas achadas na natureza. Os compostos naturais, além de diversos, são extremamente específicos nas suas atividades biológicas. Essa característica decorre do fato de que, praticamente, todos eles terem alguma capacidade de se ligar a receptores, além disso, alguns autores atribuem ao sucesso dos medicamentos de origem natural à facilidade de absorção pelo organismo em relação às substâncias puramente sintéticas (HARVEY, 2008).

Apesar da riqueza da flora brasileira representada pelos seus biomas de uma biodiversidade exuberante, pouco tem sido realizado para transformar esse potencial

numa vantagem competitiva. Mesmo sendo uma potencial fonte de recursos, algumas desvantagens são citadas para travar o desenvolvimento de produtos oriundos de fontes naturais, entre elas: as dificuldades para o abastecimento e fornecimento para a indústria farmacêutica e as complicações associadas ao arcabouço normativo que regula as questões de acesso aos recursos genéticos, conhecimento tradicional associado e a repartição de benefícios (HARVEY, 2008).

A Amazônia é a maior floresta tropical das Américas, local onde se acredita abrigar um terço das espécies do mundo e possui cerca de 60% de sua totalidade no Brasil distribuídas entre todos os estados da região Norte, parte do Maranhão e estados de Mato Grosso e Goiás. Esta imensa diversidade biológica é proporcionada pela marcante diversidade geológica da região, que apresenta relevo diferenciado, grandes temperaturas e precipitações. Estima-se que o número de espécies botânicas da Amazônia tenha sido sistematicamente subestimado, de tal forma que a biodiversidade de plantas provavelmente inclui pelo menos o triplo das espécies já conhecidas. Diante disso, o bioma Amazônia é uma importante fonte de novos produtos farmacêuticos (DE AZEVEDO CALDERON *et al.*, 2010).

2.18.3. Extratos Vegetais

Os extratos são preparações concentradas, de diversas consistências possíveis, obtidas a partir de matérias-primas vegetais secas, que passaram ou não por tratamento prévio (inativação enzimática, moagem, etc.) e preparadas por processos envolvendo um solvente. Isso implica basicamente em duas etapas no processo de fabricação: a separação dos compostos específicos de um meio complexo (a droga, ou parte das plantas utilizadas, raiz, caule, folha) com a utilização de um solvente; e a concentração, por eliminação mais ou menos completa dos solventes. Assim, o isolamento e determinação dessas substâncias contribui para a química de produtos naturais e para o desenvolvimento científico de novos fármacos (BRAZ FILHO, 2010).

É possível definir tradicionalmente um extrato pela relação entre a quantidade de droga tratada e a quantidade de extrato obtida. Da planta seca e moída até as moléculas puras, existem muitas incertezas em relação à ação e toxicidade. As plantas medicinais são usadas extensivamente pela população porém seu uso indiscriminado pode desencadear efeitos adversos. Portanto, somente por estudos

químicos e farmacológicos é possível a confirmação de sua eficácia, qualidade e segurança (BONOMINI, 2013).

. A necessidade global de uma prevenção alternativa, opções de tratamento e produtos para doenças bucais surge devido ao aumento da incidência de doenças, aumento da resistência por bactérias patogênicas aos antibióticos atualmente utilizados. Assim, a fitoterapia pode ser uma resposta para opção de tratamento alternativo, pois é segura, eficaz e mais econômico (MOEINTAGHAVI, 2012; SINGH *et al.*, 2016).

2.18.4. Técnicas de extração

A extração a partir de espécies vegetais é uma das primeiras etapas para a obtenção dos produtos com propriedades terapêuticas. Conhecidos os princípios ativos inerentes a determinada droga vegetal, opera-se muitas vezes, a sua retirada para um solvente, obtendo-se assim, formas terapêuticas mais convenientes ao manuseio e administração. Os solventes mais empregados para obtenção de extratos como matéria prima farmacêutica são a água, etanol, acetona glicerina, propilenoglicol ou misturas destes. O agente extrator geralmente é um líquido volátil orgânico podendo ser removido por evaporação após ter extraído a quantidade de material desejada. Na obtenção de produtos vegetais utiliza-se preferencialmente o material seco pois apresenta vantagens como interrupção do processo de degradação, redução da contaminação e proliferação de micro-organismos, armazenamento e transporte facilitados (BONOMINI, 2013).

Os processos mais utilizados são a maceração, percolação, turbolise e sonicação. Na maceração o material vegetal é dividido em pequenos fragmentos ficando em contato com o líquido extrator por um período longo, em ambiente fechado e temperatura ambiente ou mais elevada, sob agitação. Ao final do processo o líquido extrator é separado e o resíduo prensado. A percolação utiliza aparelhos especiais (percoladores). O solvente que é renovado continuamente, percola a camada de planta pulverizada. Na decocção, processo parecido com a maceração, utiliza geralmente a água como solvente. Há o aquecimento e ebulição juntamente com a planta. A infusão é outra técnica muito utilizada para obtenção de chás de plantas medicinais. Utiliza sempre a água como solvente à temperatura de

ebulição, vertida sobre o material vegetal moído, deixados até que esfrie (PACHU, 2007).

Medicamentos à base de plantas medicinais podem ter sua qualidade afetada por muitos fatores como a estação do ano, tempo da colheita, locais de cultivo, processamento pós colheita, procedimentos de extração e preparação. Os marcadores químicos, relacionados com a autenticação da espécie vegetal, pesquisa de novas matérias primas, otimização de métodos de extração e purificação, determinação da pureza, são fundamentais na avaliação da qualidade dos medicamentos fitoterápicos podendo levar a descoberta de novos produtos (BONOMINI, 2013).

2.18.5. Rendimento

Sabe-se que o modo de uso, mais prevalente, pela população de plantas medicinais é da erva fresca ou *in natura*, pois se acredita que assim há garantia de que todos os compostos responsáveis pelo efeito estarão presentes. Contudo, a estocagem e comercialização *in natura* destas espécies tornam-se inviáveis, pois a planta fresca possui alto teor de água, o que facilita a proliferação de microrganismos e as reações enzimáticas que podem provocar sua deterioração ou até mesmo degradação do princípio ativo. Buscando solucionar tal problema, testou-se métodos gravimétricos de secagem natural e artificial. Contudo, definir o melhor tipo de secagem é fundamental, pois a metodologia ideal deve ser aquela que promova a maior porcentagem de perda de água e não altere o princípio ativo (RODRIGUES, 2011).

2.18.6. Espécies Vegetais de Interesse

a) *Ficus insipida* Willd (caxinguba ou cuaxinguba)

O gênero *Ficus* pertence à família Moreácea e é composto por cerca de 750 espécies de plantas lenhosas espalhadas principalmente em regiões tropicais (SERRATO *et al.*, 2004). Várias espécies têm sido utilizadas tradicionalmente em uma extensa variedade de remédios etnobotânicos como antidiabéticos, anti-helmínticos, anti-hipertensivos, laxantes, antirreumáticos, digestivos e antidisentéricos (OLAOKUN *et al.*, 2013). Alguns estudos mostram a presença de triterpenos, esteróis, polifenóis, flavonoides, cumarinas, alcaloides entre outros

metabólitos (RAMADAN *et al.*, 2009). Os polifenóis estão entre os maiores constituintes de compostos medicinais, principalmente devido à capacidade de sequestrar radicais livres.

b) *Curatella americana* (caimbé)

A *Curatella americana* é popularmente conhecida como lixeira ou caimbé e possui uma ampla dispersão tropical, ocorrendo principalmente em savanas, florestas secas e cerrados (HIRUMA-LIMA *et al.*, 2009).

Cascas, folhas e talos são utilizados como analgésicos e anti-inflamatórios em formas de chás e infusões contra artrite, diabetes e hipertensão (HIRUMA-LIMA *et al.*, 2009; DE TOLEDO *et al.*, 2011).

O extrato clorofórmico das cascas apresenta comprovada atividade hipoglicemiante em animais com hiperglicemia, diminuição dos radicais superóxidos e efeito antihiperglicemiante em animais normoglicêmicos (OSPINA *et al.*, 1995). A análise fotoquímica do extrato etanólico das cascas mostrou presença de taninos, cumarinas e terpenos (OSPINA *et al.*, 1995).

Apesar do uso na medicina popular, a ação genotóxica direta do extrato etanólico das cascas de *C. americana* foi identificada em estudos com cepas de *E. coli* (VILAR *et al.*, 2009).

Considerando a variedade de moléculas presentes na natureza e a comercialização dessas espécies vegetais por habitantes da região amazônica, cujo conhecimento etnofarmacológico fornece informações na pesquisa de novos produtos e moléculas com propriedades medicinais, torna-se importante a realização de uma triagem com intuito de identificar as potencialidades farmacológicas desses extratos.

c) *Byrsonima intermedia* A. Juss (saratudo)

A família Malpigiaceae é uma das maiores famílias em angiospermas (ANDERSON, 1979), e uma das dez mais bem representadas no cerrado, bioma em que há grande carência de estudos. Esta família é formada por aproximadamente 1200 espécies, distribuídas em 60 gêneros, de ocorrência em regiões tropicais (Norte, Nordeste e Região Central do Brasil), América Central e Guianas (JOLY, 1977), sendo que 50% são encontradas no Brasil. No Nordeste brasileiro, ocorrem

diversas espécies dos gêneros *Byrsonima*, *Camarea*, *Galphimia*, *Stigmaphyllon* e *Peixotoa* (AGUIAR *et al.*, 2005). Apesar desse grande número de espécies vegetais, pouco é conhecido acerca da constituição química da família. Poucos trabalhos na literatura reportam a presença, em geral, de triterpenos, flavonoides e esteroides em algumas espécies (DAVID e SANTOS, 2003). Esses vegetais apresentam diferentes tipos de habitat, frutos e caracteres citogenéticos. Em geral, as espécies arbustivas e arbóreas são muito comuns (LOMBELLO e MARTINS, 2003). No Brasil, a maior parte das espécies da família Malpigiaceae é conhecida por ser utilizada com finalidade terapêutica e como alimento. Desse modo, há uma crescente necessidade de mais estudos fitoquímicos com essas espécies (DAVID & SANTOS, 2003).

Espécies vegetais pertencentes ao gênero *Byrsonima* Rich. Ex. Kunth. são caracterizadas por alta plasticidade fenotípica, com ampla ocorrência nas diversas composições florísticas da América do Sul (MAMEDE, 2013). Felício e colaboradores (1995) descreve *Byrsonima* como sendo essencialmente americana, encontrado nas regiões tropicais e subtropicais da América do Sul. O gênero não é exclusivo de fitofisionomias fechadas, ocorrendo alguns deles em ambiente de cerrado, nos Estados de Mato Grosso e Goiás e no litoral Norte e Nordeste do país (ANDERSON, 1979). Suas flores coloridas possuem glândulas de óleo na base, atraindo diversas espécies de fauna, em especial a entomofauna (SIGRIST; SAZIMA, 2004).

As espécies do gênero *Byrsonima* são conhecidas popularmente como “muricis” e, em geral, são plantas nativas do Norte, Nordeste e região central do Brasil, podendo também ser encontradas em algumas regiões serranas do Sudeste. São plantas geralmente arbóreas, com galhos retorcidos e porte médio, podendo chegar a 5 metros de altura. Os “muricis” do Brasil são muitos e variados, distinguindo-se pelas cores e locais de ocorrência. Assim, são conhecidos como “murici branco”, “murici amarelo”, “murici vermelho”, “murici da chapada”, “murici do brejo”, “murici da mata”, entre outros. São plantas de fácil adaptação, se desenvolvendo bem em solos areno-argilosos, com clima quente e boa ventilação. A fase de floração e frutificação ocorre durante todo o ano, dependendo da ocorrência das chuvas. Muitas espécies de murici fornecem frutos bastante consumidos e apreciados, que são base da alimentação de algumas populações nas mais variadas preparações culinárias (no Nordeste, por exemplo, frutos da espécie *Byrsonima crassifolia*, amassados com farinha, fornecem a “cambica de murici”, rica em gorduras e de alto teor nutritivo). O cultivo e a colheita dessas plantas ainda são

bastante rudimentares, não existindo dados e parâmetros agrônômicos seguros. No Estado do Pará, por exemplo, há um grande interesse em desenvolver pesquisas agrônômicas com os muricizeiros, devido ao grande consumo das frutas dessas plantas nessa região (PIMENTEL, 2005).

Várias espécies do gênero *Byrsonima* têm sido utilizadas na medicina popular, com destaque para *Byrsonima intermedia*, porém são plantas que não apresentam os estudos suficientes para que possam ser empregadas de maneira racional. Estudos que forneçam parâmetros de qualidade, eficácia e segurança, bem como os ensaios químicos, biológicos ou farmacológicos, são fundamentais para que cientificamente esta planta seja validada como fitoterápico.

Byrsonima intermedia A. Juss. é uma espécie com ocorrência em ambientes xéricos e áreas úmidas, como as florestas ripárias. *B. intermedia* são plantas com características típicas das plantas do cerrado. É um arbusto no máximo 1,60 m de altura. A copa é desuniforme por causa dos galhos que quebram com facilidade, o caule é castanho a acinzentado. Possui tronco cilíndrico e quando velho possui fissuras quadriculadas com casca escura (JOLY, 1977). Suas folhas são simples, coriáceas, glabras na face superior e pubescentes na face inferior, com ápice ou ponta lanceolada (FERRI, 1969). As flores são bem vistosas, amarelas, mas quando velhas são alaranjadas, cíclicas, formando cachos de 10 a 15 cm, em número de 15 a 35 flores dispostas em pequenos racemos (JOLY, 1977). A época de florescimento é de outubro a dezembro (RODRIGUES *et al.*, 2001). As flores de *B. intermedia* possuem diversas características que permitem classificá-las como flores contendo óleo, com cinco sépalas dotadas de elaióforos na superfície abaxial, zigomorfia, estames e estiletos voltados para o centro da flor, conservando assim aspectos gerais para a família, como atração e orientação (ANDERSON, 1990). Segundo Oliveira e colaboradores (2007), as flores são unguiculadas, hermafroditas, zigomorfas, pentâmeras, diurnas e sem odor perceptível. O cálice é amarelado e gamossépalo, cada uma de suas sépalas possui um par de glândulas produtoras de óleo (elaióforos). A corola é dialipétala, apresentando cinco pétalas amarelas e alternadas as sépalas, sendo a superior diferente das demais. O androceu é diplostêmone, constituído por anteras bitecas, basifixas e rimosas que apresentam pólen esbranquiçado e pulverulento, com 89,16% de viabilidade. O gineceu é composto por ovário súpero, tricarpelar, trilocular, com um óvulo por lóculo de placentação apical; possui três estiletos longos e terminais, livres entre si e

persistentes no fruto. O fruto apresenta dimensões de 7,70 -11,00 × 7,77- 10,78cm, com massa da matéria fresca de 0,29 - 0,71g (SOUTO e OLIVEIRA, 2005a). Em relação ao número de sementes, são encontrados frutos sem semente madura, com uma, duas ou três sementes, sendo esta última à condição mais frequente (SOUTO e OLIVEIRA, 2005b). Segundo Lorenzi e Matos (2002), *Byrsonima intermedia* assim como outras espécies como *B. spicata*, *B. stipulacea* e *B. verbascifolia* apresentam baixa taxa de germinação, a emergência lenta das plântulas e dormência tegumentar das sementes. Porém são plantas de fácil adaptação, se desenvolvendo bem em solos arenoargilosos, com clima quente e boa ventilação (PIMENTEL, 2005). As imagens em seguida mostram o aspecto da *Byrsonima intermedia* (Figura 7).

Figura 7. Aspecto da *Byrsonima intermedia*. Fonte: SANNOMIYA, M (2006).



Fonte: SANNOMIYA, M(2006).

Baseando-se em estudos etnofarmacológicos, as folhas e o tronco dessa planta são utilizados popularmente para diarreias, disfunções gástricas e úlceras (SANNOMIYA *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2001). O uso popular de murici-pequeno se dá através do chá das cascas do caule, o que leva ao extrativismo e consequentemente morte da planta. Um dos problemas que têm limitado a ampla utilização dessa espécie é a produção de mudas, pois suas sementes apresentam baixo índice de germinação, devido à dormência tegumentar (PINTO e BERTOLUCCI, 2002; MONTEIRO, ALBUQUERQUE e ARAÚJO, 2005).

O extrato metanólico bruto das cascas, folhas e flores foram avaliados quanto sua atividade anti-inflamatória por Carvalho (2010) que observou que na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ eles apresentaram atividade anti-inflamatória nas larvas de *Danio rerio* com lesão na nadadeira caudal. Foi demonstrado o efeito gastroprotetor do extrato metanólico obtido das folhas de *Byrsonima intermedia* em modelos experimentais *in vivo* (SANTOS *et al.*, 2006). Os mesmos autores avaliaram a atividade analgésica e antiulcerogênica do extrato clorofórmico das folhas desta espécie em modelos experimentais em camundongos e verificaram que o extrato clorofórmico inibiu significativamente as contorções abdominais. O aumento das lesões gástricas induzidas pelo extrato clorofórmico, indicou que seus constituintes potencializam o efeito lesivo do piroxicam. Esta hipótese foi comprovada no modelo de contorções abdominais por ácido acético, onde se verificou a presença de um efeito antinociceptivo no extrato clorofórmico de *Byrsonima intermedia* (SANTOS *et al.*, 2006). Ainda, foi realizada a comparação da ação antiúlcera e atividade gastroprotetora em duas partições do extrato metanólico das folhas de *Byrsonima intermedia*. Resultados mostraram que a fração aquosa e fração acetato de etila reduzem a lesão ulcerativa e tem ação gastroprotetora, além de ter mostrado ação efetiva em doença gástrica crônica, porém as partições apresentaram gastroproteção, de maneiras diferentes, a fração aquosa concentrou maior parte dos constituintes ativos, de modo a apresentar, portanto maior gastroproteção de modos diferentes e em doses inferiores à fração acetato (SANTOS *et al.*, 2009).

O estudo fitoquímico da *Byrsonima intermedia* revelou a presença de catequinas, derivados da quercetina, ácido gálico e galato de metila e outros compostos isolados (SANNOMIYA *et al.*, 2004). Análises do extrato bruto de suas folhas demonstraram que *B. intermedia* possui lupeol e b-amirina, saponinas triterpênicas pentacíclicas (FELÍCIO *et al.*, 1995). Além dessas substâncias, esta planta apresenta em suas folhas, um bi flavonoide denominado amentoflavona (SANNOMIYA *et al.*, 2007).

Santos e colaboradores (2007) demonstraram o efeito cicatrizante da partição acetato de etila obtido a partir das folhas de *Byrsonima intermedia*, no qual evidenciou a intensa proliferação celular que contribuiu para regeneração da mucosa e submucosa lesada.

d) *Anacardium spp* (cajuí)

A família Anacardiaceae possui aproximadamente 81 gêneros e 800 espécies, presentes em ambientes secos a úmidos, principalmente em terras baixas nas regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo, estendendo-se até regiões temperadas (PELL, 2011). Nas Américas existem aproximadamente 32 gêneros nativos, sendo que 77% das espécies são endêmicas do continente americano e apenas os gêneros *Antrocaryon*, *Camptosperma*, *Cotinus*, *Pistacia*, *Rhus*, *Spondias* e *Toxicodendron* possuem representantes em outros continentes também (TERRAZAS, 1999). No Brasil, estão catalogados 14 gêneros com 57 espécies de Anacardiaceae, sendo que 14 delas são restritas ao país. Trata-se de um grupo de plantas lenhosas resiníferas, cujas partes jovens exalam aroma e sabor característicos. As folhas são simples ou compostas, e as flores são dialipétalas, isostêmones ou obdiplostêmones, com ovário súpero geralmente uni ou tricarpelar, mas unilocular e uniovulado, produzindo frutos carnosos ou secos unisseminados (SILVA-LUZ e PIRANI, 2010).

Do ponto de vista ecológico, algumas espécies de Anacardiaceae são indicadas para reflorestamento, como o pau-pombo (*Tapirira guianensis* Aubl.), que é utilizado em programas de reflorestamentos ambientais, recuperação de áreas degradadas, em projetos de reposição de mata ciliar e estabilização de dunas (FERRETI *et al.*, 1995, KAGEYAMA e GANDARA, 2000). O caráter de pioneirismo e agressividade competitiva dessa espécie, somados à sua tolerância higromórfica e boa interação biótica, garante o sucesso regenerativo em ambientes fortemente edáficos e também com influência antrópica (KAGEYAMA e GANDARA, 2000). Isso a caracteriza como espécie típica dos estádios pioneiro e secundário inicial (FERRETI *et al.*, 1995) e, possivelmente, como uma bioindicadora do caráter edáfico dos ambientes naturais ou antropizados. É importante salientar que os frutos de muitas espécies da família são atrativos da fauna, principalmente da avifauna (KRÜGEL *et al.*, 1998, GUIMARÃES, 2003), demonstrando a importância da sua utilização em programas de recomposição de vegetação.

Algumas espécies de Anacardiaceae têm uso na medicina popular brasileira pela potencial atividade antifúngica (FENNER *et al.*, 2006). Aproximadamente 32 gêneros da família contêm espécies conhecidas que causam dermatites (MITCHELL, 1990). As dermatites podem ser causadas pela resina, sendo atribuídas

principalmente aos compostos fenólicos e catecólicos ou à mistura destas substâncias, denominados lipídios fenólicos.

O gênero *Anacardium* (L.) pertence à família Anacardiaceae e foi descrito por Lineu, que em 1753, referiu a espécie *Anacardium occidentale* como característica deste. O gênero apresenta distribuição natural ocorrendo na região neotropical (MITCHELL; MORI, 1987). Diversas evidências indicam que a origem da espécie ocorreu mais provavelmente na região Norte da América do Sul e parte da América Central, com maior destaque para o Brasil (BARROS; CRISÓSTOMO, 1995). Esta hipótese é reforçada pelos relatos de Alphonso de Candolle que registrou a ocorrência da planta em estado selvagem em grandes áreas de abrangência e diferentes habitat no Brasil, Guianas, Panamá e Antilhas (BARROS; PAIVA; CAVALCANTI, 1999). Embora a origem americana do cajueiro ainda não seja totalmente comprovada, é certo que o Brasil é o mais importante centro de diversidade do gênero *Anacardium*, com o principal centro de diversidade na região amazônica, e centro secundário de diversidade na região do Planalto Central (MITCHELL; MORI, 1987).

As características gerais do gênero foram descritas por Mitchell e Mori (1987). As flores são reunidas em uma inflorescência do tipo panícula, rácimo composto com forma piramidal, com flores hermafroditas e estaminadas. A distribuição de flores por panículas apresenta uma proporção de 10% hermafroditas para 90% de flores masculinas, exibindo um sistema alterno de antese das flores, no qual as flores masculinas abrem-se por volta das 6 h e fecham-se às 10 h da manhã, já nas flores hermafroditas a antese ocorre no período entre as 10 h e as 12 h. Em relação à deiscência das anteras, nas flores masculinas ocorre por volta das 9 h e nas hermafroditas às 10 h.

Os principais agentes polinizadores das flores de *Anacardium* são as abelhas das espécies *Apis mellifera* e a indígena *Centris tarsata* (FREITAS; PAXTON, 1998; FREITAS; PAXTON; HOLANDA-NETO, 2002) sendo a primeira mais importante (PAULINO, 1992; SANTOS *et al.*, 2007). Após ser fertilizada, além do desenvolvimento do fruto, também ocorre a hipertrofia do pedicelo das flores bissexuais de *Anacardium*, resultando em um pedúnculo carnoso, comestível e suculento.

O período de floração ocorre na estação seca e a frutificação mais intensa no início da estação chuvosa. Na região Nordeste brasileira, o pico de frutificação dá-se

entre os meses de agosto e dezembro, período este coincidente com a estação seca e, conseqüentemente, de menor ou nenhuma produção das lavouras. Portanto, apresenta-se como uma alternativa econômica bastante promissora para as comunidades rurais que implementam sua renda com os produtos provenientes da planta, principalmente a castanha de caju (GUANZIROLI *et al.*, 2009). Alguns fatores como a semelhança na morfologia floral, o compartilhamento dos mesmos agentes dispersores, os indicativos de poucas barreiras reprodutivas, associados à ocorrência natural de indivíduos com características intermediárias entre as diferentes espécies do gênero, possibilitam a ocorrência de híbridos interespecíficos, como sugerido para as três espécies simpátricas do Planalto do Brasil, a saber: *A. occidentale*, *A. humile* e *A. nanum* (MITCHELL; MORI, 1987).

Segundo Mitchell e Mori (1987), o gênero *Anacardium* é constituído por dez espécies. Dentre estas, a única espécie cultivada comercialmente é a *Anacardium occidentale* L., o caju, sendo também a de maior dispersão (BARROS; CRISÓSTOMO, 1995).

A terminologia caju tem origem no tupi “acaiú” (VIEIRA *et al.*, 2006), da qual deriva a palavra cajuí (caju+tupi í, pequeno) (Figura 8).

Figura 8. *Anacardium* spp (cajuí) pertencente à EMBRAPA Meio-Norte/UEP, Parnaíba- PI. Fonte: Borges (2015).



Fonte: Borges (2015).

De acordo com a classificação da indústria processadora de castanha de caju, recebem a terminologia cajuí, as plantas que possuem peso do pedúnculo inferior a 3,33g (CARBAJAL; SILVA JÚNIOR, 2003). A classificação mais usada para designar plantas como cajuí é baseada na morfometria do fruto (castanha + pedúnculo), sendo consideradas cajuí aquelas plantas que possuem castanha e pedúnculo pequenos. A literatura reporta cajuís com peso médio das castanhas variando em uma amplitude de 0,63 g a 6,26 g (GOMES *et al.*, 2009; CORRÊA *et al.*, 2002), peso médio do pedúnculo variando de 15 a 20 g e comprimento de 3 cm (CRESPO; SOUZA, 2014), sendo considerados como cajuís pequenos aqueles que apresentam peso do pedúnculo inferior a 10 g (GOMES *et al.*, 2013). No entanto, é necessário evidenciar que estas duas classificações levam em consideração apenas dois caracteres morfológicos (castanha e pedúnculo), não sendo válida para determinação de espécies de *Anacardium*. Lima (1988), ao realizar a descrição de espécies de *Anacardium*, classificam como cajuí (castanha + pedúnculo) as espécies: *A. amilcarianum*, *A. giganteum*, *A. humile*, *A. microcarpum*, *A. nanum* e *A. pumilum*.

A insuficiência de estudos de classificação botânica das plantas de cajuí presentes na vegetação piauiense inviabiliza a categorização destes em uma das espécies do gênero *Anacardium*. Tendo em vista que a classificação como cajuí é realizada tendo por base apenas o fruto (castanha + pedúnculo) e a existência de várias espécies de cajuí ocorrentes no território nacional, estes são designados apenas como *Anacardium* spp (CRESPO; SOUZA, 2014).

O porte das plantas de cajuí varia de 2 a 5 metros de comprimento, com a copa atingindo até mais de 15 metros de altura. Apresentam folhas mais duras que o caju comum, de coloração verde, sem pelos e forma obovada. A inflorescência segue o mesmo padrão descrito para o gênero (CRESPO; SOUZA, 2014). O fruto verdadeiro, a castanha, abriga em seu interior uma amêndoa. O pedúnculo hipertrofiado e suculento possui coloração que varia do amarelo ao vermelho e forma que vai de ligeiramente achatada a arredondada possuindo grande variabilidade para caracteres químicos (GOMES *et al.*, 2009).

O tempo médio de emergência das sementes varia de 14,47 a 18,91 dias e índices de velocidade de emergência de 0,33 a 0,6, apresentando de 52,78% a 100% de germinação. Existe uma correlação significativa positiva entre as características da castanha e o tempo médio de emergência, ou seja, as castanhas

maiores e mais pesadas são as mais vigorosas (CORREA *et al.*, 2002). O cajuí apresenta uma grande dispersão na região Nordeste brasileira, principalmente nos domínios do cerrado. No estado do Piauí, esta dispersão estende-se além dos cerrados, com populações naturais desta planta encontradas em áreas de transição, como nos tabuleiros costeiros (RUFINO *et al.*, 2007), constituindo-se característica da vegetação litorânea. O litoral piauiense ocupa uma área territorial de 66 km abrangendo os municípios de Parnaíba, Ilha Grande, Luís Correia e Cajueiro da Praia (ANDRADE *et al.*, 2012). Nesta região, a ocorrência do cajuí se dá nas áreas de restinga e carrasco, sendo mais concentrada nas comunidades Labino, Pedra do Sal, Cal e Tatus, onde desempenham grande importância ecológica, caracterizando-se como a vegetação pioneira de dunas (CRESPO; SOUZA, 2014). A importância ecológica do *Anacardium* é bastante difundida; na Nigéria, antes mesmo de serem conhecidos como uma importante cultura comercial, o cajueiro foi introduzido em áreas degradadas principalmente para arborização e controle da erosão (ALIYU; AWOPETU, 2007). Esta frutífera nativa não apresenta somente importância ambiental, mas também desempenha um grande valor socioeconômico. Várias pesquisas apontam para a importância econômica e social do cajuí no litoral piauiense, especialmente para as populações que vivem nas regiões onde há maior abundância desta planta. Assim como o caju comum, a temporada de floração e frutificação do cajuzeiro ocorre entre os meses de junho a dezembro, sendo o período de maturação dos frutos mais concentrado nos meses entre agosto e novembro (SILVA *et al.*, 1992; RUFINO, 2004). Este período é coincidente com a entressafra de culturas tradicionais (como, por exemplo, o arroz e o feijão), onde a disponibilidade de alimentos é escassa, deste modo o cajuí apresentasse como uma importante fonte alternativa de renda e alimentação para a população local (RUFINO *et al.*, 2008).

O aproveitamento do cajuí envolve tanto o fruto (castanha) como o pseudofruto (pedúnculo). A partir da castanha obtém-se a amêndoa que é muito apreciada, podendo ser consumida sozinha ou participando como ingrediente na composição de outros produtos, como por exemplo, na produção de sorvetes (RUFINO *et al.*, 2008). O pedúnculo bastante nutritivo, com elevados teores de vitamina C (ALMEIDA, 2009), além de açúcares, compostos fenólicos e minerais, é consumido in natura ou na produção de doces (massa, ameixa, calda e cristalizado), temperos e bebidas (RUFINO *et al.*, 2008). A conscientização da população local em

relação à importância do cajuí é uma forma de colaboração aos programas de conservação e manejo adequado deste recurso genético vegetal. Segundo Rufino (2004), produtores locais conscientes da importância da espécie optam por preservar as plantas nativas de cajuí na área de suas propriedades. Essa relação de reconhecimento da importância e preservação do cajuí pela população local é muito importante, uma vez que, as populações das comunidades que vivem ao entorno são os principais agentes no extrativismo e comercialização do cajuí na região litorânea piauiense (RUFINO *et al.*, 2008). Nesta região observa-se além do cajuí, a ocorrência de plantas nativas de caju (*A. occidentale*). Constataram-se também semelhanças entre as duas, principalmente ao analisar a morfometria foliar, chegando por vezes a existir sobreposição em relação a este caractere para as duas plantas (VIEIRA; MAYO; ANDRADE, 2014), com registros de indivíduos que apresentam castanha e pedúnculo intermediários entre cajuí e caju, comumente denominado pela população local de cajuá (EMBRAPA MEIO-NORTE, 2002).

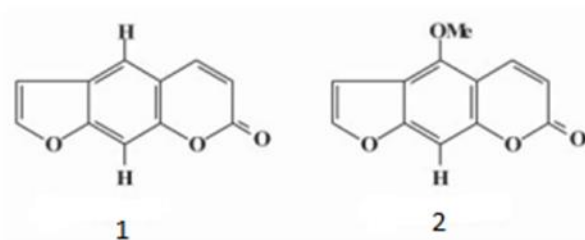
e) *Brosimum parinarioides* Ducke (amapá)

Conhecido vulgarmente como amapá ou amapá-doce, membro da família Moreacea, é representado no Brasil por 15 espécies (LIMA *et al.*, 2013). Os arbustos ou árvores podem atingir até 40 m de altura, caracterizados pela produção abundante de látex, conhecido como “Leite de Amapá” (CASTRO, 2006).

O látex é utilizado como medicamento e empregado na alimentação como fortificante (GALUPPO, 2003). O leite do amapazeiro é substituído nas comunidades amazônicas, pelo leite bovino e apresenta significativos teores de proteínas, lipídios, fibras, cálcio e potássio (PALHETA *et al.*, 2009; MATTIETTO *et al.*, 2009). Além de seu potencial antioxidante e de ser considerado um alimento nutracêutico, está relacionado com a cura de doenças respiratórias, gastrite, inflamação no útero, anemia e problemas musculares (PALHETA *et al.*, 2009; GALUPPO, 2003).

Componentes do látex de uma espécie do gênero *Brosimum* são empregados no tratamento do vitiligo. Tal capacidade foi conferida à ação fotossensibilizante de duas furanocumarinas presentes no látex: o psoraleno e o bergapteno (Figura 5) (POZETTI, 1968; MCKEON, 1981).

Figura 9. Psoraleno (1) e bergapteno (2). Fonte: Celeghini e colaboradores (2007).



Fonte: Celeghini e colaboradores (2007).

Esses dois compostos são os princípios ativos do Viticromin®, medicamento utilizado no tratamento do vitiligo, elaborado a partir da porção inferior das raízes e caule (LEÃO *et al.*, 2007).

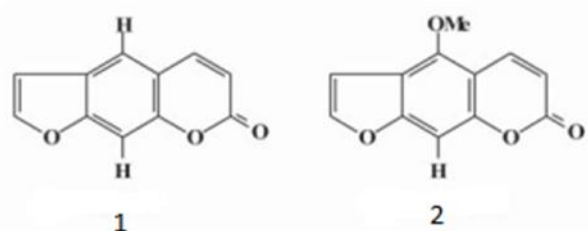
No nordeste brasileiro, as cascas e folhas de *B. gaudichaudii* são utilizadas na forma de banho ou chás para o tratamento de manchas na pele e dermatites (AGRA *et al.*, 2008). A atividade antioxidante já foi observada em frações mais polares dos extratos obtidos através da casca (QUADROS *et al.*, 2002).

A família Moraceae é composta por cerca de 1050 espécies distribuídas em 37 gêneros. Na reserva florestal Adolpho Ducke, a família é representada por 44 espécies (RIBEIRO *et al.*, 1999). Seus representantes são predominantemente arbóreos ou arbustivos. E quase todos sem exceção têm látex e folhas inteiras, dispostas alternadamente. No Brasil, destacam-se os gêneros *Ficus*, *Brosimum*, *Dorstenia* e *Cecropia* (DALL'STELLA, 2008). Essa família possui muitas espécies que são comercialmente exploradas pela indústria de madeira, papel, borracha, na alimentação e na produção indireta da seda, como é o caso da *Morus alba* (amora), que tem seus frutos empregados na alimentação e suas folhas são consumidas por lagartas para a produção de sedas de alta qualidade (TEIXEIRA, 1999). Outras apresentam grande importância na produção de moléculas biologicamente ativas, como é o caso da espécie *B. gaudichaudii* de onde foram isolados os compostos, psoraleno e o bergapteno, duas furanocumarinas, substâncias responsáveis pela ação contra o vitiligo (POZETTI, 1969; MCKEON, 1981; VARANDA, 2002) (Figura 8).

O gênero *Brosimum*, compreende aproximadamente 13 espécies que ocorrem na América tropical. Porém, apenas duas espécies vêm sendo mais estudadas fitoquimicamente, *B. gaudichaudii* e *B. rubescens* (TORRES *et al.*, 1997). Da espécie *Brosimum rubescens* foram isolados diversas substâncias tais como os triterpenos 3β -acetoxi-olean-12-eno-28-al e β -sitosterol (HAYASIDA *et al.*, 2008) e a cumarina xantiletina (HAYASIDA *et al.*, 2011) que apresenta um potencial biológico, sendo reportada pelas atividades antiplaquetária, antifúngica e herbicida e alguns derivados que possuem atividade em linhagens de células leucêmicas (Figura 9).

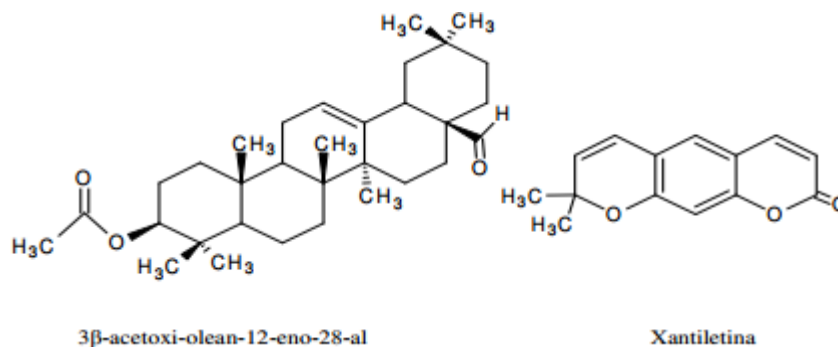
Da espécie *B. gaudichaudii*, como foi citado anteriormente já foram isolados as duas furanocumarinas, psoraleno e bergapteno e ainda outras cumarinas como, xantiletina, luvangetina (VIEIRA *et al.*, 1999) (Figura 10).

Figura 10. compostos, psoraleno (1) e o bergapteno (2).



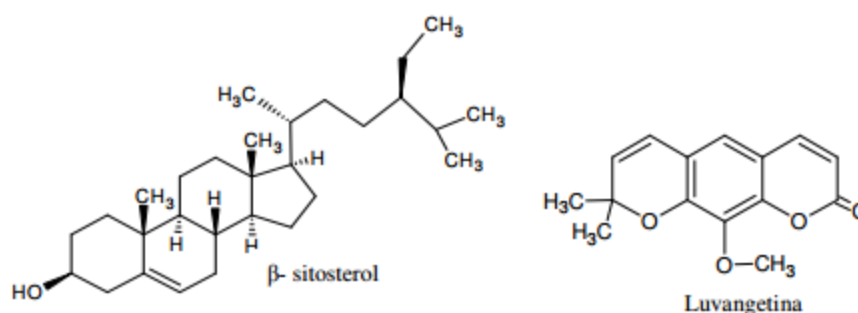
Fonte: Celeghini e colaboradores (2007).

Figura 11. triterpenos 3β -acetoxi-olean-12-eno-28-al e β -sitosterol e a cumarina xantiletina



Fonte: Celeghini e colaboradores (2007).

Figura 12. Estrutura das substâncias isoladas de *B. gaudichaudii* e *B. rubescens*.



Fonte: Celeghini e colaboradores (2007).

Da espécie *Brosimum acutifolium* subespécie *acutifolium*, foi isolado a 4',7' – dihidroxi-8-prefenil- flavana, denominada anaflavana, fitoconstituente então inédito das frações diclorometano do extrato alcoólico. Foi determinada inicialmente a toxicidade empregando-se em camundongos e posteriormente, realizados testes clínicos com o extrato hidroalcoólico das cascas do caule que indicaram uma melhora significativa dos pacientes portadores de artrite reumatóide (TEIXEIRA, 2000).

A espécie *B. parinarioides* é conhecida popularmente como amapá, amapá-doce, amapá-roxo, amaparana, murerana, amapazeiro (MADY, 2000; BORRÁS, 2003). Membro da família Moreacea, esta espécie nativa da região da região amazônica é representado no Brasil por 15 espécies (LIMA *et al.*, 2013). Os arbustos ou árvores podem atingir até 40 m de altura, caracterizados pela produção abundante de látex, conhecido como “Leite de Amapá” (CASTRO, 2006). É uma árvore de grande porte podendo atingir até 40 m de altura. Suas folhas são de tamanhos variáveis com no máximo 22 cm de comprimento e 10 cm de largura, duras e com base mais ou menos arredondada (REVILLA, 2002; CORREA, 1978). Apresenta entrecasca avermelhada e sua madeira interna amarela bem clara. O tronco é cilíndrico e bem ereto. Ao ser cortado, libera um aroma muito agradável e solta um leite (látex) branco e grudento (Figura 11). O amapá doce é somente encontrado em terra firme pois não resiste à cheia do rio (SOUZA *et al.*, 2003). É uma espécie comum nas matas da Amazônia, sendo possível encontrar de 3 a 5 indivíduos por hectare (REVILLA, 2002). Normalmente a produção do látex é artesanal, e devido a não existência de uma organização empresarial sobre esse

produto, este corre o perigo de ter adulterações por outra espécie parecida (REVILLA, 2002).

Figura 13. *Brosimum parinarioides*: látex, folhas e tronco respectivamente.



O látex de *B. parinarioides* é extraído através de cortes no tronco sendo usado como um ótimo cicatrizante de feridas, e também, é empregado por sua atividade antitussígena e antiinflamatória. Em emplastos e contusões é utilizado diretamente nas áreas afetadas. É ainda indicado com a finalidade de cura de doenças respiratórias, tônico, fortificante ou energizante, onde se recomenda beber diariamente meio copo do látex. Na cosmética, é utilizado como removedor de manchas na pele (REVILLA, 2002; BORRÁS, 2003). Devido ao seu alto potencial medicinal, esse látex é muito apreciado pelas comunidades rurais, sendo substituinte do leite bovino na alimentação humana (GALUPPO, 2004). Segundo Souza et al., 2003, o leite de amapá de *B. parinarioides* também é popularmente empregado para o tratamento de hemorróidas e ameba e já foi muito utilizado por seringueiros na época em que a extração da borracha era uma atividade lucrativa para o caboclo. Eles tinham costume de “batizar” o leite da seringueira com um pouco de leite de amapá, para aumentar o volume de borracha a ser comercializado. Segundo experiências populares o leite de amapá é consumido há muitos anos pelas populações amazônicas, por administração oral, sendo ingerido in natura, diluído em leite ou em água e muitas vezes agitado ou batido no copo manualmente ou mecanicamente com o auxílio de liquidificador. A espuma formada, abundante e densa, é retirada (BORRÁS, 2003). Outro modo de preparo é tirar duas colheres do leite da árvore, colocar em um prato ou vaso e bater bem com uma colher até

conseguir tirar nove escumas (colheres de espumas). Jogar fora estas nove escumas e colocar o que sobrou em um copo. Completar o volume do copo, enchendo-o com leite (em pó, já preparado) ou algum chá (preferencialmente de casca de laranja). Beber uma colher do preparado, três vezes ao dia (manhã, tarde e a noite). Repetir o tratamento até os sintomas desapareçam (SOUZA *et al.*, 2003).

O látex é utilizado como medicamento e empregado na alimentação como fortificante (GALUPPO, 2003). O leite do amapazeiro é substituído nas comunidades amazônicas, pelo leite bovino e apresenta significativos teores de proteínas, lipídios, fibras, cálcio e potássio (PALHETA *et al.*, 2009; MATTIETTO *et al.*, 2009). Além de seu potencial antioxidante e de ser considerado um alimento nutracêutico, está relacionado com a cura de doenças respiratórias, gastrite, inflamação no útero, anemia e problemas musculares (PALHETA *et al.*, 2009; GALUPPO, 2003).

Componentes do látex de uma espécie do gênero *Brosimum* são empregados no tratamento do vitiligo. Tal capacidade foi conferida à ação fotossensibilizante de duas furanocumarinas presentes no látex: o psoraleno e o bergapteno (Figura x) (POZETTI, 1968; MCKEON, 1981). Esses dois compostos são os princípios ativos do Viticromin®, medicamento utilizado o tratamento do vitiligo, elaborado a partir da porção inferior das raízes e caule (LEÃO *et al.*, 2007).

No nordeste brasileiro, as cascas e folhas de *B. gaudichaudii* são utilizadas na forma de banho ou chás para o tratamento de manchas na pele e dermatites (AGRA *et al.*, 2008) e a atividade antioxidante já foi observada em frações mais polares dos extratos obtidos através da casca (QUADROS *et al.*, 2002).

Galuppo (2004) evidenciou a presença dos seguintes compostos nas frações testadas de leite do *Brosimum parinarioides* liofilizado, tais como os alcalóides, antraquinonas, derivados de cumarina, esteróides e triterpenóides, e purinas. No trabalho desenvolvido por Galuppo, também foi realizado testes físicos e químicos para avaliar o valor nutricional do leite de amapá comparado com o leite de vaca e extrato de soja (leite de soja), todos relacionados com a dose diária recomendada. Como resultado, o leite do amapá-doce apresentou 58% de umidade e boa quantidade de alguns minerais em sua composição. O cálcio presente no leite do amapá-doce foi superior ao do leite de vaca e leite de soja e à “Dose Diária Recomendada” (DDR). Apresentou menor quantidade de fósforo, comparado ao leite de vaca e soja, porém com valor significativo relacionado com a DDR. A presença de magnésio e a porcentagem de proteínas totais também foram próximas à

recomendada, sendo os valores de proteínas maiores que os encontrados no leite de vaca e de soja, razão pela qual esta espécie tende a torna-se uma importante fonte alimentar para as famílias da região amazônica. Gai e colaboradores (2009), realizaram estudo sobre a composição inorgânica de leite de amapá, no qual analisaram 38 amostras de leite de três espécies do gênero *Brosimum* (*B. parinarioides*, *B. potabile* e *B. utile ovatifolium*), oriundas do município de Presidente Figueiredo, Amazonas e verificaram que as amostras apresentaram maiores concentrações de magnésio, fósforo, sódio, potássio e alumínio e concentrações semelhantes de cálcio e cloro que amostras de leite de vaca, justificando seu uso popular como sucedâneo deste *Brosimum parinarioides* foi à espécie em que as menores quantidades de alumínio e potássio foram observadas. Estes resultados sugerem o potencial nutricional do leite do amapá doce, e o valor do conhecimento sobre o mesmo, como reforço alimentar.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Determinar o potencial antifúngico de cinco extratos secos de espécies vegetais do bioma Amazônia frente às principais linhagens causadoras de candidíase oral.

3.2. Específicos

- Estabelecer a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM);
- Verificar as alterações morfológicas e estruturais nas linhagens de cêndidas através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), submetidas à ação dos extratos;
- Avaliar a toxicidade desses extratos em modelo de células de fibroblastos (L929) e queratinócitos (HaCaT) e modelo de *Artemia salina*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Espécies Vegetais

Todas espécies vegetais utilizadas neste estudo foram adquiridas no mercado “Ver-O-Peso”, em Belém no estado do Pará, Brasil (latitude 01270210 0S e longitude 48300160 0W) em novembro de 2014: *Byrsonima intermedia* (saratudo), *Anacardium occidentale* (cajuí), *Ficus insipida* Willd (cuaxinguba), *Brosimum parinarioides* (amapá), *Curatella americana* (caimbé).

4.2. Obtenção dos extratos vegetais

Os extratos foram obtidos a partir de 20 g das cascas das plantas e etanol 70% (v/v) o suficiente para 1 litro de preparação, sob uma maceração estática, durante 72 horas e ao abrigo da luz. Antes disso, as cascas das plantas foram trituradas e o pó resultante peneirado (malha número 20). Após a maceração, os extratos foram filtrados, rotaevaporados (Rotavapor® R-210, Buchi, Suíça) e liofilizados (alfa 1-4 LD mais, Cristo, Alemanha) sob pressão de 1,8 mbar e temperatura de -20°C. Os cálculos dos rendimentos foram realizados conforme mostrado a seguir:

$$\text{Rendimento (\%)} = \left[\frac{\text{massa obtida após liofilização}}{\text{massa da droga vegetal}} \right] \times 100$$

4.3. Atividade Antimicrobiana

4.3.1. Espécies fúngicas

Para as análises microbiológicas foram empregadas as leveduras *Candida albicans* American Type Culture Collection (ATCC) 10231, *C. glabrata* (Taniwaki, M.H.) Coleção de Culturas Tropical (CCT) 0728, *C. krusei* (FTI) CCT 1517, *C. guilliermondii* (CCT) 1890 provenientes da Fundação André Tosello (Campinas, São Paulo, Brazil).

4.3.2. Atividade antifúngica: determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)

A concentração inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (MFC) foram estabelecidas de acordo com o protocolo M27-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2002).

As suspensões fúngicas foram obtidas com as respectivas linhagens após 48 h de crescimento a 35 ± 2 °C, preparadas com o inóculo adicionado de salina estéril 0,9 % (v/v). A densidade da solução foi ajustada em espectrofotômetro Libra S12 (Biochrom, Denmark) empregando o comprimento de onda fixo de 530 nm com 89-90 % de transmitância (FALAHATI *et al.*, 2014) e posteriormente diluído em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (*Sigma Aldrich Chemistry*, EUA) tamponado com ácido 3(N-morfolino) propanosulfônico (MOPS) (JTBaker, Alemanha) e o pH foi ajustado com solução de hidróxido de sódio (0,5 M) para 7.0 ± 0.1 para obtenção de $5 - 25 \times 10^2$ CFU/mL.

Os extratos foram diluídos em RPMI-1640 tamponado acrescido de tampão MOPS com auxílio de 2 % de etanol a 70 % (v/v) e avaliados na faixa de 9,7 a 5.000 µg mL, sendo todas as análises realizadas em triplicata.

O ensaio foi realizado em microplaca de polipropileno estéril com 96 poços de fundo chato (*Sarstedt*, Alemanha). Em cada poço da placa, foram adicionados 100 µL das respectivas diluições de cada extrato previamente preparadas e 100 µL das suspensões fúngicas padronizadas. O controle de crescimento consistiu de 100 µL do mesmo meio de cultura inoculado, 2 µL de etanol 70% e 98 µL de RPMI 1640 tamponado com MOPS. O controle negativo consistiu em 200 µL de meio não inoculado. Anfotericina B, (Cristália, Brazil) e Nistatina foram empregados como fármacos de referência em concentrações que variaram de 0,0313 a 16,0 µg/mL.

Realizadas as diluições, as microplacas foram incubadas a 35 ± 2 °C/48 h. A CIM foi estabelecida como a menor concentração na qual não se observou microscopicamente crescimento fúngico. A MFC foi determinada usando o método da microdiluição. Alíquotas de 10 µL foram retiradas dos poços onde não se observou crescimento no procedimento da CIM e transferidas para uma nova placa contendo 1 mL de caldo *Sabouraud* dextrose (SDB) e incubada a 35 ± 2 °C por 48 h. Após período de incubação, a menor concentração com ausência de crescimento fúngico foi classificada como a CFM.

4.3.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras para a observação por MEV foram preparadas a partir de colônias de espécies fúngicas não submetidas a tratamento farmacológico (controle negativo) e de colônias expostas aos fármacos de referência e aos extratos vegetais deste estudo. Foram realizadas as etapas a seguir: a padronização das suspensões fúngicas foi realizada em espectrofotômetro a 89-90% de transmitância a 530nm; os agentes antifúngicos foram diluídos em meio RPMI-1640 tamponado com MOPS correspondente ao valor de CIM; as suspensões fúngicas, juntamente com as substâncias-teste, foram colocadas em microplacas e incubadas a 35 ± 2 °C por 48 h. Após o período de incubação foram realizadas sucessivas lavagens com tampão fosfato 0,1 M, centrifugadas a 1.301 G e fixadas por meio da adição de solução de glutaraldeído 2,5 % (v/v). As amostras foram armazenadas por 12 h a 8 °C para se iniciar a desidratação das mesmas com uma sequência de etanol (50, 70, 90 e 100 %) em intervalo de tempo de 15 minutos. As amostras desidratadas foram aderidas à lamínula de vidro com o auxílio de poli-*D*-lisina e fixadas em *stubs* de alumínio, metalizadas com fina camada de ouro em metalizador (Balzers FL-9496/Furstentum Liechtenstein) e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (JSM-5310, JEOL) a 25-Kv de energia e distância de trabalho de 17 mm. Todas as eletromicrografias foram capturadas no Centro de microscopia eletrônica de varredura do Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

4.3.4. Citotoxicidade

a) Avaliação da viabilidade celular pelo método de MTT

Para o teste de viabilidade celular foram utilizadas linhagens de fibroblastos de camundongos (L929) e de queratinócitos (HACAT). As células foram cultivadas em meio de cultura *Eagle* modificado por Dulbecco (DMEM) (Nutricell, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, EUA), 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina, tampão *HEPES* 10 mM (MOSMANN, 1983). As células foram semeadas separadamente em placas estéreis de fundo chato de 96 poços (*Sarstedt*, Alemanha) na densidade de 5000 células/mL por poço, e incubadas em estufa a 37 ± 2 °C com 5 % de CO₂ por 48 h. Após a incubação, foi realizada a

substituição do meio de cultura pela solução das amostras avaliadas (fármacos de referência e os extratos vegetais). As placas foram novamente incubadas em incubadora mantida a 37 ± 2 °C com 5 % de CO₂ por 48 h. Foram preparados dois controles, um com diluente - etanol 70 % (v/v), e outro sem adição de qualquer tratamento. Os testes foram realizados em quintuplicata. Após 48 h, retirou-se o meio de cultura e adicionou-se 10 % de [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT) (5 mg/mL) (CASTRO-LONGORIA; VILCHIS-NESTOR; AVALOS-BORJA, 2011) em DMEM, 100 µL por poço, e as placas foram reincubadas em estufa a 37 ± 2 °C com 5 % de CO₂ por 3 h. O precipitado produzido foi então dissolvido em DMSO e a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro de microplaca - SpectraMax 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) empregando comprimento de onda fixo de 540 nm.

Os resultados foram analisados com o auxílio do *software Graphpad Prism* versão 6 e submetidos à análise de variância, seguida por teste *post hoc* de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

b) Avaliação da viabilidade biológica pelo modelo da *Artemia salina*

Uma das formas de avaliar a toxicidade de extratos vegetais é por meio do Bioensaio com *Artemia salina*, pois ele é simples, rápido e barato.

Inicialmente foi realizado o preparo da água do mar preparada artificialmente. Para o preparo de 1 litro de água do mar, foram utilizados: NaCl (24g), CaCl₂.2H₂O (1,5g), KBr (0,1g), KCl (0,7g), Na₂SO₄ (4,0g), NaHCO₃ (0,3g), MgCl₂.6H₂O (11g) a qual foi armazenada na geladeira até o momento do uso.

Foram utilizadas as larvas da *Artemia salina* na forma de metanúplio, empregando-se a concentração letal média (CL₅₀) como parâmetro de avaliação da atividade biológica (Lopes et al., 2002). Para a obtenção dos metanúplios, cistos de *A. salina* foram incubados em água do mar artificial sob iluminação artificial por 48 h. Após eclosão, os metanúplios foram expostos a diferentes concentrações dos extratos de interesse (10 a 1000 µg/mL). Das diluições obtidas com as respectivas concentrações, 5 mL foram colocados em tubos de ensaio e adicionados 10 metanúplios. O teste foi realizado em triplicata. Um grupo controle negativo foi preparado contendo apenas os metanúplios em água do mar artificial e o timol foi

empregado como controle positivo. O conjunto permaneceu em incubação sob luz artificial por 24 h e então foi realizada a contagem do número de metanúplios vivos e mortos para determinação da CL_{50} . A CL_{50} foi determinada pela regressão linear entre o logaritmo da dose fornecida e as unidades probabilísticas de porcentagem de mortos pelo teste dos probitos (LITCHFIELD; WILCOXON, 1949).

Uma solução estoque na concentração de 1 mg/mL dos extratos a serem testados e “água do mar” foram preparadas iniciando o preparo das amostras. Pesadas as massas de 45 mg de cada extrato foi medido em proveta o volume de 45 mL de “água do mar”. Obtendo a solução substância e “água do mar” preparada, realizou as diluições nas concentrações finais de 1 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ da solução substância com água do mar artificial obtendo um volume final de 5,0 mL como segue na tabela abaixo. Cada diluição foi feita em tubo de ensaio pequeno sem tampa em quadruplicata.

Tabela 1: Concentração dos extratos e suas diluições para testes em água do mar.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	1000	500	100	50	10	5,0	1,0
Solução estoque (mL)	5,0	2,5	0,5	0,25	0,05	0,25	0,05
“Água do mar” (mL)	-	2,5	4,5	4,75	4,95	4,75	4,95

Iniciou-se o preparo do controle negativo do ensaio realizando o preparo em quadruplicata de tubos de ensaios contendo 5,0 mL de “água do mar”. O controle negativo (branco), neste tubo de ensaio foi adicionado apenas 10 larvas em 10 mL de solução salina, sem adicionar o extrato.

Após o preparo de todas as diluições necessárias iniciou-se a pesca das larvas de *Artemia salina* evitando qualquer tipo de movimentação do béquer utilizado como incubadora para não ocorrer mistura dos ovos não eclodidos com as larvas a serem pescadas, tomando-se o cuidado para não pescar ovos, apenas as larvas. Com o auxílio de uma pipeta inserida dentro da “incubadora” no local onde se percebe maior concentração de larvas realizou a sucção das larvas; foram

depositadas várias gotas sobre um material plástico de superfície plana com o material presente na pipeta a fim de permitir uma visualização mais fácil. Com uma pipeta as larvas foram pescadas e colocadas nas gotas anteriormente preparadas tendo total controle do número de larvas pescadas e inoculadas em cada tubo de ensaio dez larvas de *Artemia salina* , procurando sempre a exatidão e precisão da pesca.

Realizada a inoculação das larvas de *Artemia salina* em cada tubo preparado iniciando sempre a inoculação dos tubos mais diluídos para os mais concentrados a fim de evitar contaminações, os tubos foram armazenados sob iluminação artificial constante por um período de 24 h,

Após o período de incubação realizou-se a contagem do número de larvas *Artemia salina* mortas para cada diluição. Finalmente os valores encontrados foram avaliados para a determinação da toxicidade da substância avaliada. A CL_{50} é determinada pela regressão linear entre o logaritmo da dose fornecida e as unidades probabilísticas de percentagem de mortos pelo teste dos probitos (LITCHFIELD; WILCOXON, 1949).

5. RESULTADOS:

5.1. Método da obtenção dos extratos

Foram obtidos os seguintes rendimentos para cada extrato: *Byrsonima intermedia* (Saratudo) – rendimento (15,2 %), *Brosimum parinarioides* (amapá) – rendimento (10,45 %), *Anacardium occidentale* (Cajuí) – rendimento (23,4 %) apresentando maior rendimento comparado aos demais, *Curatella americana* (caimbé) – rendimento (13,51 %), *Ficus insipida* Willd. (cuaxinguba) – rendimento (2,30 %) sendo este último apresentando baixo rendimento em relação aos demais extratos (vide tabela 1). Esta diferença quantitativa entre os rendimentos encontrados pode ser decorrente de diversos fatores, dentre eles: local de crescimento da planta, hora da coleta, luminosidade, altitude, temperatura ambiente e nível pluviométrico, que podem ter efeitos críticos tanto na quantidade quanto na qualidade dos óleos essenciais.

Tabela 2. Rendimentos dos extratos secos obtidos após a liofilização.

Espécie	Parte utilizada	Rendimento
<i>Byrsonima intermedia</i> (Saratudo)	Casca	15,2%
<i>Brosimum parinarioides</i> (Amapá)	Casca	10,45%
<i>Anacardium occidentale</i> (Cajuí)	Casca	23,4%
<i>Curatella americana</i> (Caimbé)	Casca	13,51%
<i>Ficus insipida</i> (Cuaxinguba)	Casca	2,30%

5.2. Atividade antimicrobiana

Os ensaios de atividade antimicrobiana com os extratos hidroalcoólicos apresentaram atividade antifúngica contra as linhagens de *Candida* do estudo. Foram determinados as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações fungicidas mínima (CFM) para cada extrato. Em todos os experimentos os antimicrobianos testados no controle positivo, mostraram que o ensaio foi realizado de forma adequada (**Tabela 3**).

Tabela 3. Potencial antifúngico dos fármacos de referência e dos extratos de interesse. Resultados expressos em $\mu\text{g/mL}$ *UI/mL

Substâncias Teste	<i>C. krusei</i> CIM/CFM	<i>C. glabrata</i> CIM/CFM	<i>C. guilliermondii</i> CIM/CFM	<i>C. albicans</i> CIM/CFM
<i>Byrsonima intermedia</i> (Saratudo)	0,312/1,25	0,156/>5	2,5/2,5	0,0097/5
<i>Brosimum parinarioides</i> (Amapá)	1.25/2,5	2,5/2,5	2,5/5	2,5/>5
<i>Anacardium occidentale</i> (Cajuí)	0,625/1,25	0,625/1.25	0,156/2,5	1,25/>5
<i>Curatella americana</i> (Caimbé)	0,625/125	0,625/1,25	0,078/0,625	0,0097/>5
<i>Ficus insipida</i> (Cuaxinguba)	0,312/1,25	0,312/2,5	0,156/1,25	1,25/>5
Anfotericina B	2/2	0,25/0,5	0,03/03	0,125/0,5
Nistatina*	16/16	4/16	8/64	2/20

Os resultados de CIM e CFM foram complementados por resultados micromorfológicos obtidos utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV) para cada extrato. As eletromicrografias de varredura confirmaram os danos físicos e alterações morfológicas que poderiam comprometer a viabilidade das células fúngicas tratadas com os extratos de *Byrsonima intermedia* (Saratudo), *Brosimum parinarioides* (amapá), *Anacardium occidentale*, *Curatella americana* (caimbé), *Ficus insipida* Willd. (cuaxinguba) ou Nistatina e Anfotericina B quando comparadas àquelas não tratadas.

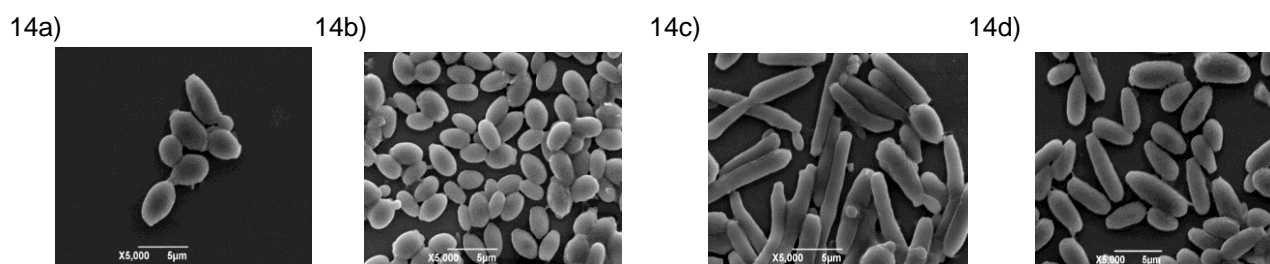


Figura 14. Eletromicrografias das linhagens de *Candida* sp não expostas aos tratamentos farmacológicos de interesse 14a) Imagens de MEV de *Candida* (ATCC) 10231. 14b) MEV de *C. glabrata* (Taniwaki, M.H.) CCT 0728. 14c) MEV de *C. guilliermondii* CCT 1890. 14d) MEV de *C. krusei*

(FTI) CCT 1517. Magnificação: 5000x. Barra de escala: 5µm e para as figuras com magnificação de 1500x, 10µm. MEV.

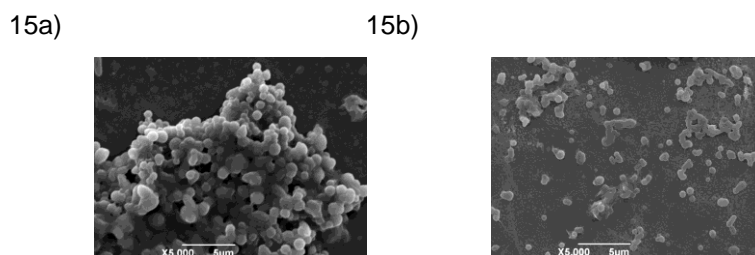


Figura 15 Eletromicrografias das linhagens de *Candida sp* expostas aos fármacos de referência. 15a - MEV de leveduras de *C.albicans* exposta à Nistatina. 15b - MEV de *C.albicans* expostas à Anfotericina B. Células com características de desidratação, muito agrupadas e compactadas. Magnificação: 5000x.

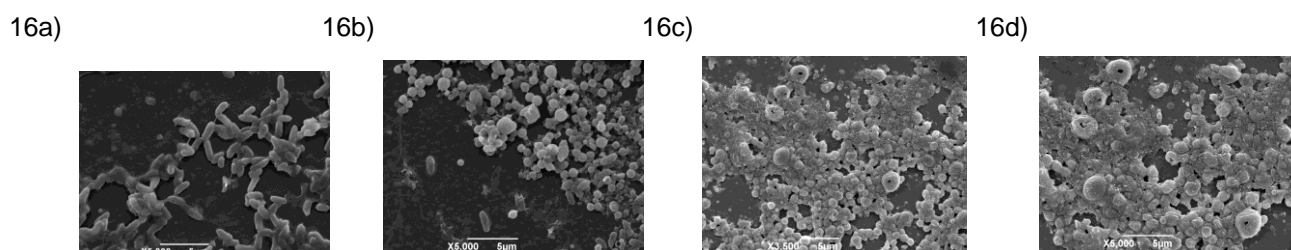


Figura 16 Eletromicrografias das linhagens de Nistatina e Anfotericina B. 16a e 16b - MEV de leveduras de *C. glabrata* expostas à Nistatina. 16c e 16d - MEV de *C. glabrata* expostas à Anfotericina B. Células apresentam alterações em sua morfologia. Magnificação: 3.500x e 5000x.

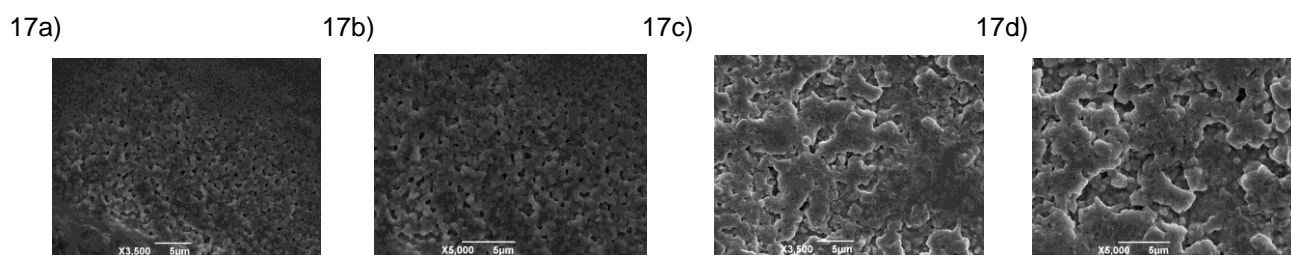


Figura 17. Eletromicrografias das linhagens de Nistatina e Anfotericina B. 17a e 17b - MEV de *C.guilliermondii* expostas à Nistatina. 17c e 17d - MEV de *C.guilliermondii* expostas à Anfotericina B. Células com características de achatamento e compressão além de agrupamento celular . Magnificação: 3.500x e 5000x.

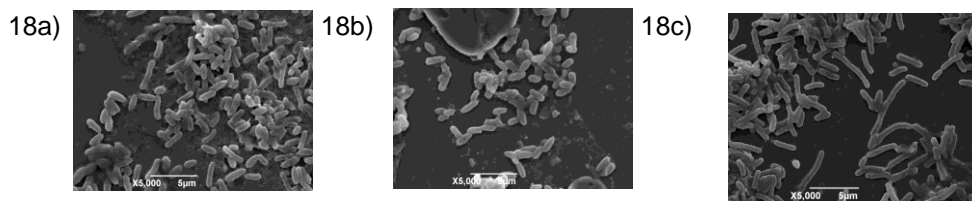


Figura 18 . Eletromicrografias das linhagens de *C. krusei* expostas à Nistatina e Anfotericina B. 18a e 18b - MEV de *C. krusei* expostas à Nistatina. 16c - MEV de *C. krusei* expostas à Anfotericina B. Magnificação: 5000x

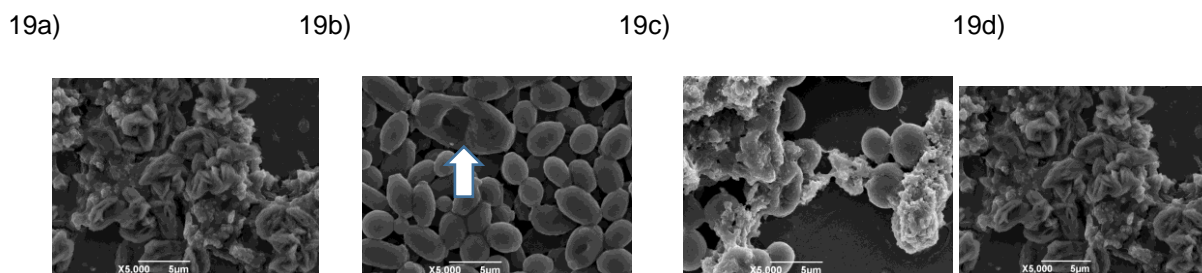


Figura 19. Eletromicrografias das linhagens de MEV de leveduras de *C. albicans* expostas à (19a) *Brosimum parinarioides*, (19b) *Anacardium occidentale*, (19c) *Curatella americana*, (19d) *Ficus insipida*. Evidenciação de zonas de cisalhamento e alteração morfológica da superfície celular e pequenas vesículas; áreas de fissuras; deformações estruturais com extravasamento de material celular. Em 19a e 19c, sugere extravasamento de material celular além de alterações de morfologia devido a permeabilidade celular frente ação dos fármacos. Em 19b, pode-se observar zonas de fissura e alterações morfológicas da superfície celular Magnificação: 5000x. Barra de escala: 5µm.. MEV: Microscopia eletrônica de Varredura.

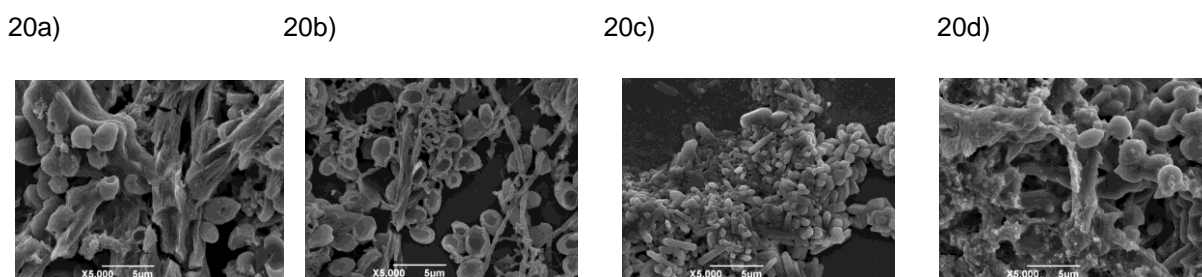


Figura 20. Eletromicrografias das linhagens de MEV de leveduras de *C. glabrata* expostas à (20a) *Brosimum parinarioides*, (20b) *Anacardium occidentale*, (20c) *Curatella americana*, (20d) *Ficus insipida*. Evidenciação de zonas de cisalhamento e alteração morfológica da superfície celular e pequenas vesículas; áreas de fissuras; deformações estruturais com extravasamento de material celular. Magnificação: 5000x. Barra de escala: 5µm.. MEV: Microscopia eletrônica de Varredura.

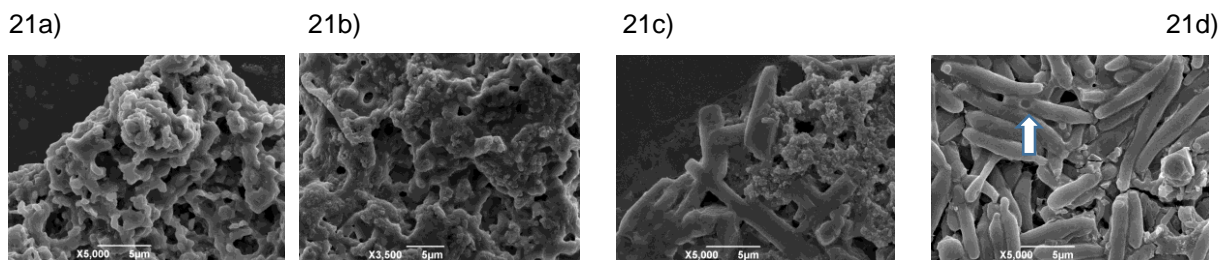


Figura 21. Eletromicrografias das linhagens de MEV de leveduras de *C. guilliermondii* expostas à (21a) *Brosimum parinarioides*, (21b) *Anacardium occidentale*, (21c) *Curatella americana*, (21d) *Ficus insipida*. Evidenciação de zonas de cisalhamento e alteração morfológica da superfície celular e pequenas vesículas; em 21d, áreas de fissuras; deformações estruturais com extravasamento de material celular. Magnificação: 5000x. Barra de escala: 5µm.. MEV: Microscopia eletrônica de Varredura.

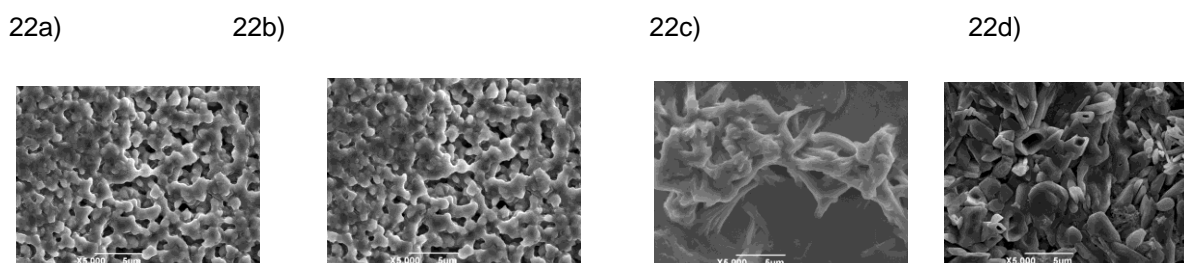


Figura 22. Eletromicrografias das linhagens de MEV de leveduras de *C. krusei* expostas à (22a) *Brosimum parinarioides*, (22b) *Anacardium occidentale*, (22c) *Curatella americana*, (22d) *Ficus insipida*. Evidenciação de zonas de cisalhamento e alteração morfológica da superfície celular e pequenas vesículas; áreas de fissuras; deformações estruturais com extravasamento de material celular. Magnificação: 5000x. Barra de escala: 5µm.. MEV: Microscopia eletrônica de Varredura.

Os dados descritivos para os testes de viabilidade celular para avaliação da citotoxicidade pelo método colorimétrico de brometo (MTT) o qual é caracterizado pela demonstração citoquímica da enzima desidrogenase succínica, que representa a taxa de respiração mitocondrial das células (GERAN *et al.*, 1972 e MOSMANN *et al.*, 1983), frente a linhagens de fibroblastos de camundongo (L929) e queratinócitos (HACAT) através de valores percentuais e desvio-padrão (DP). A análise de variância (ANOVA), realizada individualmente para cada concentração testada com as cinco espécies vegetais deste estudo e os fármacos de referência.

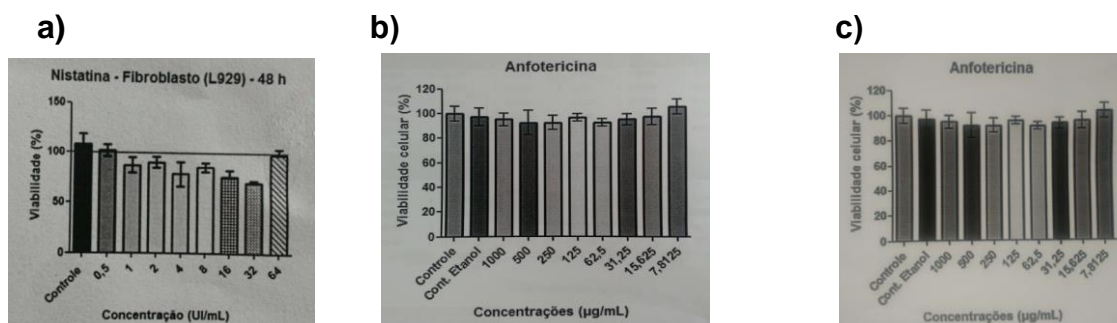
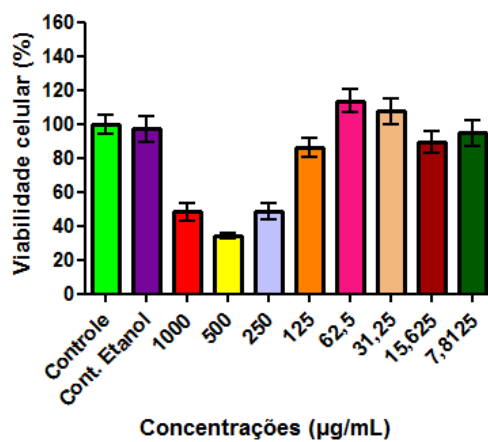


Gráfico 1. Viabilidade celular da Nistatina e Anfotericina B pelo método MTT frente a linhagens de fibroblasto murinho (L929) (a e b) e queratinócito humano (HACAT)(c).

Byrsonima intermedia (Saratudo)

Fibroblasto



Queratinocitos

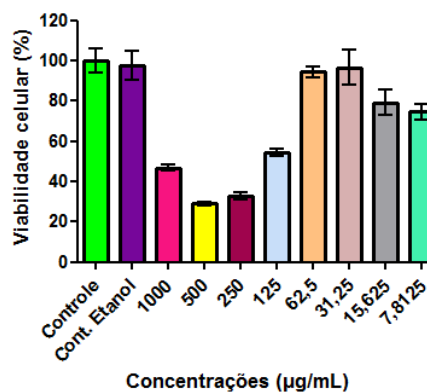


Gráfico 2. Viabilidade celular da *Byrsonima intermedia* pelo método MTT frente a linhagens de fibroblasto murinho (L929) e queratinócito humano (HaCaT).

***Brosimum parinarioides* (Amapá)**

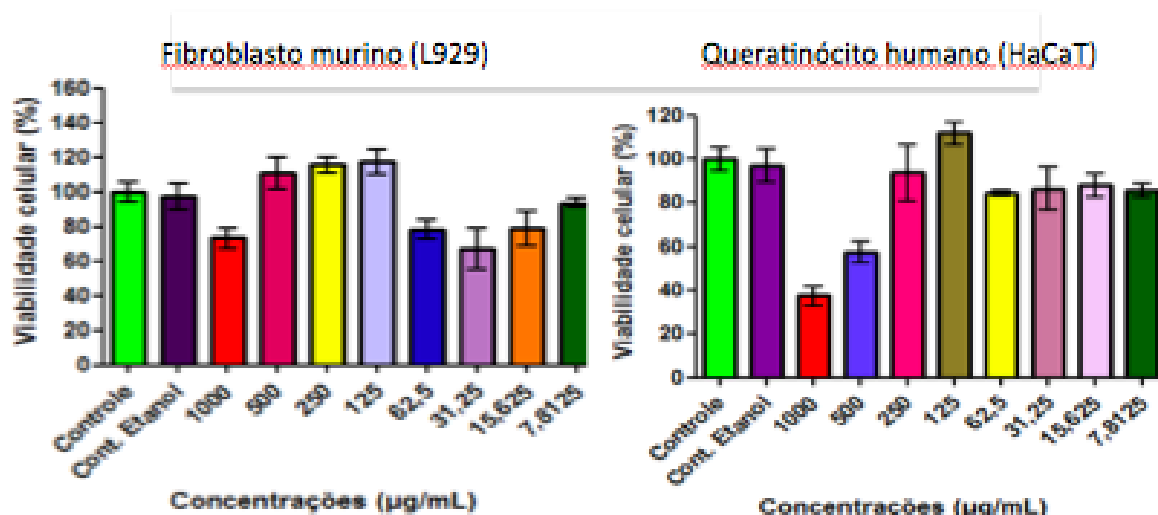


Gráfico 3. Viabilidade celular da *Brosimum parinarioides* pelo método MTT frente a linhagens de fibroblasto murino (L929) e queratinócito humano (HaCaT)..

***Anacardium occidentale* (Cajuí)**

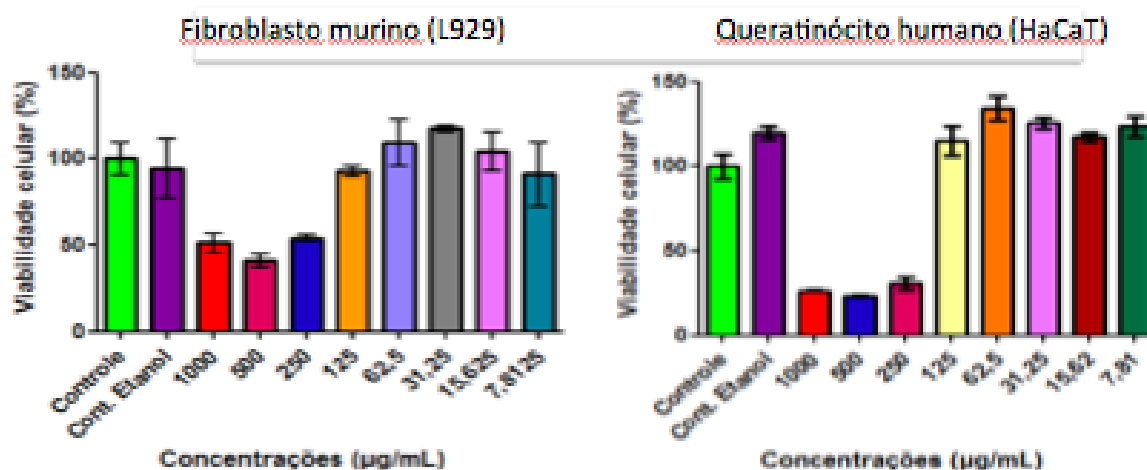


Gráfico 4. Viabilidade celular da *Anacardium occidentale* pelo método MTT frente a linhagens de fibroblasto murino (L929) e queratinócito humano (HaCaT).

Curatella americana (Caimbé)

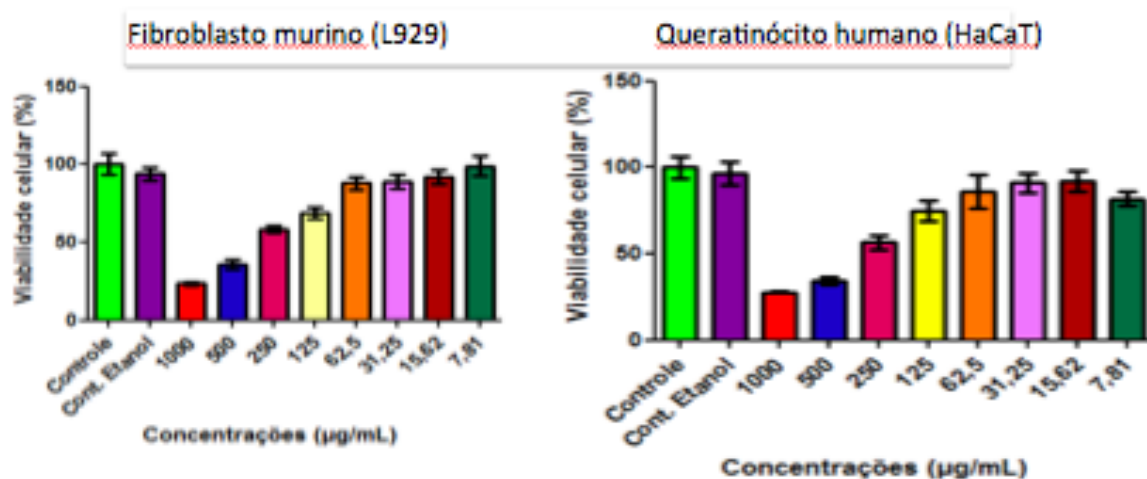


Gráfico 5. Viabilidade celular da *Curatella americana* pelo método MTT frente a linhagens de fibroblasto murinho (L929) e queratinócito humano (HACAT). Apresenta boa viabilidade celular.

Ficus insipida (Cuaxinguba)

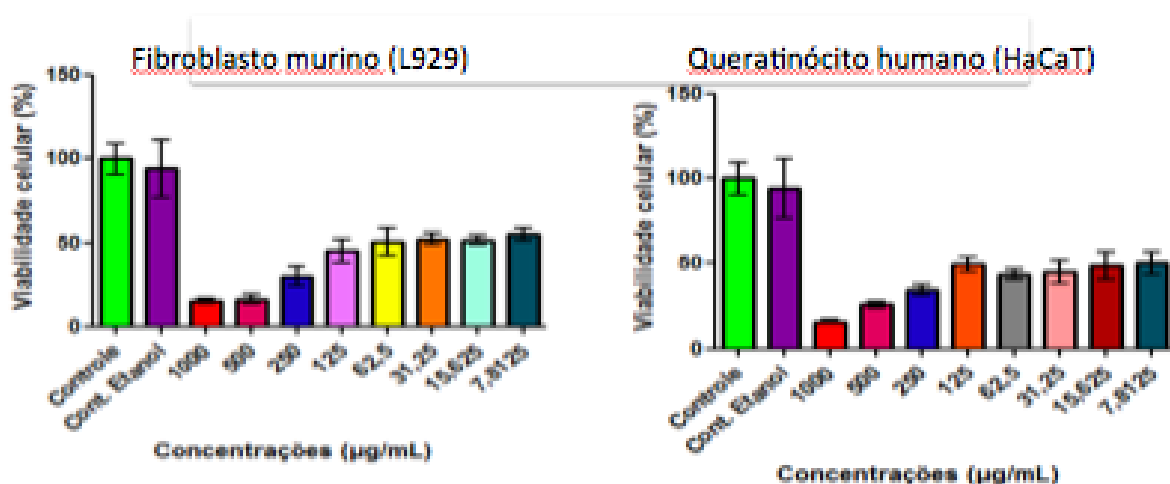


Gráfico 6. Viabilidade celular da *Ficus insipida* pelo método MTT frente a linhagens de fibroblasto murinho (L929) e queratinócito humano (HaCaT).

Substâncias Teste	<i>C. krusei</i> CIM/CFM	<i>C. glabrata</i> CIM/CFM	<i>C. guilliermondii</i> CIM/CFM	<i>C. albicans</i> CIM/CFM
<i>Byrsonima intermedia</i> (saratudo)	0,312/1,25	0,156/>5	2,5/2,5	0,0097/5
<i>Anacardium occidentale</i> (cajuí)	0,625/1,25	0,625/1.25	0,156/2,5	1,25/>5
<i>Ficus carica</i> (caxinguba)	0,312/1,25	0,312/2,5	0,156/1,25	1,25/>5
<i>Parahancornia fasciculata</i> (amapá)	1.25/2,5	2,5/2,5	2,5/5	2,5/>5
<i>Coussapoa asperifolia</i> (caimbé)	0,625/125	0,625/1,25	0,078/0,625	0,0097/>5
Anfotericina B	2/2	0,25/0,5	0,03/03	0,125/0,5
Nistatina*	16/16	4/16	8/64	2/20

Tabela 4. Resultado das CIM e CFM frente a linhagens de cândidas.

Continuando os testes de viabilidade celular foi realizado o bioensaio com *Artemia salina*, para avaliar a toxicidade dos cinco extratos vegetais demonstrando os seguintes resultados de acordo com a Tabela 5.

Substâncias Teste	DL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Byrsonima intermedia</i> (Saratudo)	80,70
<i>Brosimum parinarioides</i> (Amapá)	288,51
<i>Anacardium occidentale</i> (Cajuí)	93,17
<i>Curatella americana</i> (Caimbé)	425,63
<i>Ficus insipida</i> (Cuaxinguba)	182,78
TIMOL (controle positivo)	14,7

Tabela 5. Avaliação da toxicidade dos extratos vegetais de interesse e timol frente a *Artemia salina*. DL_{50} = Dose letal (DL) em 50% dos microcrustáceos em $\mu\text{g/mL}$.

6- DISCUSSÃO

Segundo Neto *et al.*, (2005) a candidíase está associada a alterações bucais ou sistêmicas. Para estes autores, fatores como: recém-nascido, diabetes, antibioticoterapia, xerostomia, imunossupressão e AIDS estão associados com a forma aguda, enquanto a diabetes, prótese superior, perda da dimensão vertical (queilite angular) e imunossupressão relacionam-se com a forma crônica. Relataram que a candidíase caracteriza e afeta mais de um terço dos pacientes infectados pelo vírus HIV, que podem apresentar qualquer uma das formas da doença. A deficiência de ferro pode ser considerada outro fator predisponente à candidíase, já que a infecção por *Candida albicans* atinge preferencialmente sítios que sofrem efeitos distróficos da carência de ferro, tais como: língua, comissuras labiais e unhas das mãos. Apesar de não ser comprovado, outro indicador de haver correlação entre estes fatores na promoção da candidíase é que a deficiência de ferro deprime a imunidade celular.

Com o intuito de se verificar cientificamente a eficácia de meios terapêuticos alternativos a partir de plantas medicinais, Castro; Lima (2010), realizaram alguns estudos *in vitro* utilizando o óleo essencial de *E. globulus* L. que apresentou atividade antifúngica sobre as espécies de *Candida*. Relatam ainda que a candidíase bucal pode afetar a qualidade de vida e dificultar a alimentação devido à presença de sangramento, exsudação, sensação de queimação, dor, halitose, gosto desagradável e secura da boca. Entretanto, os autores afirmam que novos estudos são necessários para avaliar o real potencial terapêutico dentro do meio bucal (MANGUEIRA *et al*, 2010).

Monroy *et al.* (2005) pesquisaram 105 usuários de prótese, com e sem lesão, e puderam constatar que o pH salivar era mais baixo em pacientes com estomatite por prótese, sendo colonizados por *C. albicans*, *S. mutans* e *S. aureus*. Segundo Salerno *et al.* (2011), valores de pH baixos são importantes tanto na adesão quanto na produção de fatores de virulência; pH em torno de 3, por exemplo, facilita a atividade enzimática de proteinases e lipases. Elguezabal *et al.* (2008) realizaram um estudo *in vitro* empregando saliva obtida de indivíduos saudáveis (que não utilizavam prótese), onde os resultados indicaram que a saliva inibiu a adesão de *C. albicans* ao polimetacrilato (PMMA). Já a adesão aos materiais plásticos das próteses é favorecida pela saliva quando o fungo se encontra em estágio de

levedura e inibida quando em fase de células germinadas, formando o tubo germinativo.

O conhecimento sobre os mecanismos que regulam a formação dessas estruturas complexas pode ser utilizado na prevenção e tratamento de várias doenças. De acordo com Aparna; Yadav (2008), Pereira-Cenci (2008), Nett *et al.* (2010) aproximadamente 65% das infecções microbianas envolve a presença de biofilmes. Um fato importante é que estes podem colonizar todo tipo de prótese. A adesão é o primeiro passo para a formação desses sistemas, pois sem isso, os microrganismos seriam removidos por meio das forças de arraste promovidas pelo fluxo salivar ou por meio do alimento. Essa adesão ocorre mediante forças de interação molecular; posteriormente, há crescimento das hifas ao redor da superfície da prótese, formação de microcolônias e do biofilme e aderência do fungo ao substrato mediada por fatores como a hidrofobicidade adesinas e produtos salivares.

As defesas do organismo desempenham papel importante na prevenção da candidíase. De acordo com Mangueira *et al.* (2010), para o tratamento, prescreve-se um anti-fúngico à base de Nistatina, usado de forma tópica 4 vezes ao dia. Quando a terapia tópica não produz resultado, indica-se a terapia sistêmica com Fluconazol 100 mg a 400 mg por dia durante quatorze dias ou cetoconazol 200 mg por dia. O Cetoconazol, que é tão efetivo quanto o Fluconazol não deve ser recomendado principalmente em pacientes idosos, devido a sua hepatotoxicidade, quando a terapia com Cetoconazol for por mais de duas semanas, devem-se realizar exames para avaliar as funções do fígado. A Anfotericina B pode ser necessária em infecções sistêmicas mais graves, por via endovenosa, em ambiente hospitalar, devido a sua toxicidade.

As plantas apresentam uma enorme diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas, o que justifica o crescente interesse de indústrias farmacêuticas na síntese de fármacos a partir destas fontes naturais. Extratos, frações e compostos isolados extraídos destas fontes têm sido estudados por pesquisadores por mostrarem significativas propriedades, entre estas a antimicrobiana (COGO *et al.*, 2010; HÖFLING *et al.*, 2010).

Para Marreiro *et al.* (2014), os testes de biocompatibilidade são essenciais na aceitação de qualquer material, juntamente com outros testes que avaliem suas propriedades. Em função do grande número de produtos lançados no mercado e,

por conseguinte, a serem avaliados, torna-se necessário aprimorar as metodologias e selecionar aquelas mais fidedignas quanto à presença de possíveis elementos tóxicos. Não existem materiais totalmente seguros, desta forma, a decisão sobre o uso destes materiais deve ser equilibrada através do conhecimento de seus potenciais riscos e benefícios de maneira que seus benefícios se sobrepõem aos riscos. As plantas contêm princípios ativos responsáveis pelas propriedades terapêuticas a elas atribuídas, mas também, por reações adversas que podem aparecer em decorrência de uso indevido ou contato direto com a mesma. O teste de hemólise *in vitro* vem sendo empregado rotineiramente em estudos de toxicidade de plantas medicinais.

Para Dutra *et al.* (2016) pesquisadores brasileiros tem se esforçado para estudar, em aspectos pré-clínicos e clínicos, algumas plantas medicinais amplamente utilizadas na medicina popular. O Brasil tem a maior quantidade de biodiversidade do mundo, representando cerca de 20 a 22% de todas as espécies de plantas conhecidas. Certamente, a área de plantas é um dos campos de investigação mais relevantes no Brasil, tal como o grande número de artigos científicos publicados em revistas científicas. Uma pesquisa realizada entre 2011 e 2013 revelou que pesquisadores brasileiros publicaram mais de 10.000 artigos científicos. No entanto, o mercado de drogas derivadas de plantas no Brasil (fitoterápicos) ainda é pequeno, representando menos de 5% de todos os medicamentos comercializados. Uma análise cuidadosa de publicações farmacológicas recentes em plantas revela que, em geral, os estudos foram conduzidos com extratos brutos, e apenas alguns artigos investigaram a segurança (toxicologia) e os mecanismos de ação subjacentes. Em contrapartida, os estudos realizados com ingredientes ativos derivados de plantas trazem noções sobre o mecanismo de ação e são comumente publicados nas revistas científicas de melhor qualidade, embora falta estudos de segurança (toxicologia) e farmacocinética. É viável citar que a pesquisa em plantas medicinais no Brasil permanece restrita, com poucos exemplos de parcerias bem-sucedidas com as indústrias farmacêuticas. De fato, será necessário um grande esforço para estimular a partilha entre a academia e as empresas farmacêuticas e melhorar o nível científico das publicações, buscando explorar aspectos mecânicos, segurança, farmacocinética e aspectos clínicos para

possibilitar o desenvolvimento de novas drogas de nossa vasta biodiversidade no futuro.

Os modelos de estudos *in vitro* são alternativas imprescindíveis na pesquisa relacionada à biocompatibilidade de materiais odontológicos, reduzindo as experimentações em animais. Todavia, apesar do desenvolvimento de grande variedade de métodos alternativos experimentais, estes ainda não substituem a experimentação animal em sua totalidade. Mesmo diante destes fatos, tendências futuras à curto prazo são a completa substituição dos testes envolvendo animais pelos testes *in vitro*. A avaliação da citotoxicidade é importante pois permite compreender o mecanismo biológico que produz o efeito citotóxico e o mecanismo de ação de diferentes substâncias durante a sua interação com os tecidos. No entanto, reconhece-se que o teste tem suas limitações. A utilização de culturas de células em monocamadas não é fisiológica e não reproduz a real arquitetura do tecido vivo em que as células subjacentes poderiam reparar as agressões sofridas. Desta forma, a presença de um efeito citotóxico *in vitro* não garante que o material é tóxico quando aplicado *in vivo*. Por outro lado, a ausência de um efeito citotóxico garante uma boa resposta clínica (CHORILLI, *et al.*, 2009; MARTINAS, *et al.*, 2013). Este estudo foi fundamental na determinação do perfil antifúngico dos extratos secos de *Byrsonima intermedia*, *Parahancornia fasciculata*, *Anacardium occidentale*, *Coussapoa asperifolia*, *Ficus carica*, os resultados mostraram que todos os extratos apresentaram atividade antimicrobiana para *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*.

A determinação da atividade antifúngica foi realizada de acordo com o protocolo M27-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2002). Todos os extratos testados mostraram consideráveis variações sobre as diferentes espécies fúngicas testadas em concentrações que variaram de 0,0097 a 5.000 µg/mL (Tabela 1). Comparando os resultados, observou-se que a ação fungicida (CFM) foi evidenciada no extrato de *Byrsonima intermedia* frente às 4 linhagens de *Candida* (CIM=9,7 - 5,000 µg/mL e CFM=1,250 - 5,000 µg/mL) enquanto os demais extratos tiveram ação fungicida somente contra 3 linhagens de *Candida* sendo elas a *Candida Krusei*, *C. glabrata* e *C. guilliermondi* e considerados inativos contra *C. albicans*, sendo considerados fungistáticos frente as 4 linhagens.

Como trabalhamos com extrato bruto dos materiais vegetais, seguimos o critério sugerido por Simonetti *et al.* (2016): obtidos os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração fungicida Mínima (CBM), os extratos vegetais foram avaliados quanto a sua ação antimicrobiana de acordo com os valores de CIM contra os patógenos estudados onde extratos que apresentam $CIM < 100 \mu\text{g/mL}$ têm potencial antifúngico promissor (bom), CIM entre 100 – 500 $\mu\text{g/mL}$ possui atividade inibitória moderada, CIM entre 500 – 1.000 $\mu\text{g/mL}$ apresenta atividade inibitória fraca e extratos que apresentaram CIM superior a 1.000 $\mu\text{g/mL}$ são inativos frente aos patógenos (Fabry *et al.*, 1998, Holetz *et al.*, 2002, Dall’Agnol *et al.*, 2003, Tanaka *et al.*, 2005, Chavasco *et al.*, 2014).

Sendo assim, de acordo com os resultados obtidos na tabela 2 , o extrato de *Byrsonima intermedia* foi considerado com ação fungicida moderada a promissora para todos os tipos de candida. O extrato de *Parahancornia fasciculata* apresentou um resultado de CIM variando de 1,25 $\mu\text{g/mL}$ a 2,5 $\mu\text{g/mL}$ e CFM de 2,5 a 5 $\mu\text{g/mL}$ sendo considerado com atividade antimicrobiana moderada e inativo contra *C. albicans*. O extrato de *Anacardium occidentale*, apresentou um resultado de CIM variando de 0,625 $\mu\text{g/mL}$ a 1,25 $\mu\text{g/mL}$ e CFM de 1,25 a 2,5 $\mu\text{g/mL}$ sendo considerado com atividade antimicrobiana moderada e inativo contra *C. albicans*. O extrato de *Coussapoa asperifolia*, apresentou um resultado de CIM variando de 0,0097 $\mu\text{g/mL}$ a 0,625 $\mu\text{g/mL}$ e CFM de 0,625 a 1,25 $\mu\text{g/mL}$ sendo considerado com atividade antimicrobiana moderada a fraca e inativo contra *C. albicans*. O extrato de *Ficus carica*, apresentou um resultado de CIM variando de 0,312 $\mu\text{g/mL}$ a 1,25 $\mu\text{g/mL}$ e CFM de 1,25 a 2,5 $\mu\text{g/mL}$ sendo considerado com atividade antimicrobiana moderada a fraca e inativo contra *C. albicans*.

A avaliação da atividade citotóxica pelo método MTT é rápida, e barata e foi descrita por Mosmann (1983) tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazam, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo da atividade citotóxica pelo método MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação. Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas: amostras sem atividade (SA), com pouca atividade (PA, inibição de crescimento

celular variando de 1 a 50%), com atividade moderada (MO, inibição de crescimento celular variando de 50 a 75%) e com muita atividade (MA, inibição de crescimento variando de 75 a 100%).

Os dados descritivos para os testes de viabilidade celular frente a linhagens de fibroblastos de camundongo (L929) e queratinócitos (HACAT) estão apresentados na Tabela 2 através de valores percentuais e desvio-padrão (DP). A análise de variância (ANOVA), realizada individualmente para cada concentração testada com as cinco espécies vegetais deste estudo e o fármaco de referência, mostrou diferenças entre as médias em todas as concentrações, exceto em $\mu\text{g/mL}$. O teste de Bonferroni, aplicado após ANOVA, demonstrou haver diferenças estatisticamente significativas entre as espécies e entre as espécies e o fármaco de referência ($p < 0,05$). Pelos resultados demonstrados, notou-se claramente uma relação inversamente proporcional entre a concentração (dose) e o aumento da viabilidade celular em todas as substâncias-teste, Não se conseguiu destacar a substância de maior/menor efeito tóxico.

Quando comparados ao fármaco de referência, o extrato de *Byrsonima intermedia*, a atividade citotóxica abaixo da concentração de $125 \mu\text{g/mL}$, apresentaram satisfatória viabilidade celular, enquanto que concentrações acima, demonstraram ser tóxicas comprometendo a viabilidade celular (Gráfico 1). O mesmo acontece com os demais extratos sendo que o extrato de *Byrsonima intermedia* se destaca por apresentar atividade fungistática e fungicida.

Para Pereira-Cenci, (2008); Melo, Nett, *et al.*, (2010); Guerra (2014) a matriz extracelular de polissacarídeo é composta essencialmente por carboidratos (glicose, frutose, manose) e proteínas segregadas pelos componentes microbianos. Convém ressaltar que as células associadas ao biofilme são fenotipicamente diferentes daquelas que se encontram livres (DERENGOWSKI, 2011).

No entanto, Silva *et al.* (2011), analisando usuários de próteses total e parcial de uma região no Nordeste do Brasil, verificaram em seu estudo que quando as variáveis independentes foram controladas (idade, sexo, tempo de uso da prótese), não houveram diferenças estatísticas significativas na prevalência da lesão entre os usuários de prótese total ou parcial. A classificação de Newton (1962) divide a estomatite por prótese em três subtipos de acordo com a aparência e a gravidade

das lesões, e é utilizada até hoje; são eles: tipo I – hiperemia puntiforme; tipo II – eritema generalizado; tipo III – hiperplasia papilar (AYUSO-MONTEIRO *et al.*, 2004; GASPAROTO *et al.*, 2009; RADFORD *et al.*, 1999; GUSMÃO, 2007; NAIK, PAI, 2011; OLIVEIRA, 2009; SILVA *et al.*, 2011; VASCONCELOS *et al.*, 2010).

Segundo Salerno *et al.* (2011), a mucosa em contato direto com a prótese, é a área mais afetada pelas lesões. A presença de bactérias, especialmente *Streptococcus* spp., podem induzir o organismo hospedeiro a produzir proteases, substâncias que favorecem a proliferação fúngica. As proteases promovem uma reação de degradação epitelial localizada, onde seus produtos, em contato íntimo com a mucosa, favorecem o aumento do exsudato inflamatório na região, facilitando a proliferação bacteriana e a colonização por *Candida* spp. Dessa forma, a lesão se inicia com o crescimento do fungo sobre a mucosa que suporta a prótese, onde o biofilme avança, gerando um processo inflamatório. Nesta fase, é comum a ausência de sintomas, embora alguns relatem dor e dificuldade para deglutir (SILVA *et al.*, 2011; NETT *et al.*, 2010; PEREIRA-CENCI, 2008) (MELO e GUERRA, 2014).

Segundo Araújo (1994) e Castro (2000), o diagnóstico da candidíase bucal é realizado através de dados clínicos e de exames laboratoriais. Os exames mais utilizados na prática odontológica são: o exame micológico de material obtido por raspagem superficial das lesões, a citologia esfoliativa e a biópsia (PEIXOTO *et al.*, 2014)

Segundo Vasconcelos *et al.* (2010), a interação entre *C. albicans* e *Streptococcus* spp. favorece a colonização pelo fungo. *Streptococcus mutans*, um membro comumente encontrado em próteses de acrílico, pode competir com *C. albicans* pelos sítios anatômicos, como também propiciar sua colonização. Contudo, a colaboração entre eles pode ser entendida como uma relação mutualística, visto que ambos são favorecidos pela co-adesão. Essa complexa interação levedura- - bactéria é intermediada tanto por mecanismos internos ao biofilme quanto externos; entre eles estão: higiene da prótese e fluxo salivar do usuário (BARBIERI *et al.*, 2007; PEREIRA, 2009). Barbieri *et al.* (2007) realizaram um interessante estudo utilizando pré-molares extraídos em tratamento ortodôntico, onde os mesmos ficaram em contato com inóculo preparado com *C. albicans* e *S. mutans* por 21 dias; período em que os pesquisadores utilizaram seis amostras de cada microrganismo (isolados a partir de amostras clínicas) e cepas ATCC como controle. Foi usada, ainda, a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) como método para avaliar a

formação dos biofilmes. O resultado mostrou que as espécies isoladas são capazes de formar biofilmes sobre a superfície dos dentes, porém, maior adesão foi obtida quando os microrganismos foram cultivados juntos, demonstrando, *in vitro*, a colaboração entre as espécies na constituição dos sistemas.

Resultado semelhante foi encontrado por Pereira (2009), estudando o efeito da terapia fotodinâmica sobre os biofilmes. A pesquisadora observou o aumento da espessura do biofilme quando *C.albicans* e *S. mutans* foram cultivados juntos. Uma investigação feita por Monroy *et al.* (2005) com 105 usuários de prótese demonstra a prevalência de *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus* na cavidade oral, da qual foram coletadas amostras para avaliação do pH, especificamente da mucosa oral, superfície da prótese e saliva. A identificação de *Candida* spp. foi realizada mediante cultivo em meio cromogênico. No caso das bactérias, além dos meios específicos, foram utilizadas as provas de catalase e coagulase, coloração de Gram e observação microscópica. Do total de pacientes, 50 foram diagnosticados com estomatite por prótese e em 39 deles foi encontrada a associação entre *C. albicans* e *S. aureus* (MELO, GUERRA, 2014).

Os fatores relevantes para a co-adesão levedura-bactéria na formação dos biofilmes têm sido foco de estudos *in vitro* e *in vivo* (NETT *et al.*, 2010). Para Ramage *et al.* (2005), o aperfeiçoamento desses estudos tem se aproximado dos resultados encontrados *in vivo*, o que demonstra confiabilidade nos mesmos. Entretanto, afirmam que há indícios de que os biofilmes formados sobre as mucosas apresentam uma organização mais complexa do que aqueles formados sobre superfícies abióticas. Ainda de acordo com Ramage *et al.* (2005), os estudos *in vitro* são importantes para ajudar a desvendar os fatores predisponentes na detecção da estomatite por prótese e compreender o papel de cada um deles. Esse conhecimento pode subsidiar a descoberta de novas terapias que visem à supressão desses fatores. Por outro lado, é conveniente destacar que essa abordagem distancia-se das condições encontradas no ambiente vivo, pois estudos *in vitro* não sofrem influência da saliva ou de fatores imunológicos (BARBIERI *et al.*, 2007; NETT *et al.*, 2010). Quantidades maiores de matriz são formadas quando os biofilmes são cultivados com pequenas agitações, o que não é observado em modelos estáticos. As pesquisas *in vitro* utilizam grande variedade de materiais e protocolos, algo que acaba gerando falta de padronização, representando, portanto, um fator que dificulta a correlação dos resultados obtidos pelos diversos

pesquisadores. Entre esses processos, encontram-se material biológico de diferentes sítios anatômicos, populações distintas e uma multiplicidade de protocolos que impedem a comparação entre os estudo (MELO, GUERRA, 2014).

De acordo com Regezi & Sciubba (2000), a candidíase se manifesta sob as seguintes formas: agudas, crônicas ou mucocutâneas. Para estes autores, há sete formas predominantes de candidíase, sendo duas agudas: candidíase pseudomembranosa (“sapinho”) e candidíase atrófica (candidíase eritematosa, estomatite ou glossite por antibióticos); duas crônicas: candidíase atrófica (estomatite por dentadura) e candidíase hiperplásica (leucoplasia por *Candida* ou candidíase tipo “leucoplasia”) e, finalmente, três formas mucocutâneas: localizada (boca, face, couro cabeludo, unhas), familiar e associada a síndromes. Seguindo a classificação de Regezi & Sciubba (2000), são apresentadas, na sequência, as características clínicas de cada tipo (NETO *et al.*, 2005).

Segundo Regezi & Sciubba, (2000) as formas agudas são diferenciadas em pseudomembranosa e atrófica, sendo a pseudomembranosa a mais comum, conhecida popularmente como “sapinho”. Na candidíase aguda há formação de pseudomembrana esbranquiçada que resulta em uma base eritematosa, quando removida. As formas crônicas da doença são conhecidas como atrófica e hipertrófica ou hiperplásica. Subdividiram as formas crônicas atróficas em estomatite associada à prótese e queilite angular e, as formas hiperplásicas em candidíase bucal crônica, candidíase leucoplásica, candidíase relacionada a endocrinopatias, candidíase cutâneo-mucosa localizada e candidíase crônica difusa. Para estes autores, todas as formas crônicas hiperplásicas podem manifestar-se isoladamente na boca, principalmente em indivíduos adultos, ou podem aparecer em localização mucocutânea, especialmente em crianças e associada a condições sistêmicas. Na candidíase crônica, a mucosa apresenta-se eritematosa ou como uma placa branca firmemente aderida. A candidíase ainda pode apresentar formas mucocutâneas do tipo localizada, aparecendo em regiões como: boca, face, couro cabeludo, unhas e regiões de dobras da pele, pode ser do tipo familiar e do tipo associada a síndromes e levar o paciente ao estado de septicemia podendo, então, ser fatal.

Segundo Neto *et al.* (2005), pacientes usuários de próteses são propensos à reinfecção, por isso os cuidados com a higiene são tão importantes. Para o autor, o procedimento de limpeza deve ser realizado com escovas adequadas, ou quando isso não for possível, com escovas convencionais e sabão neutro ou dentifrício;

outro procedimento é manter as próteses submersas em água e solução de limpeza durante a noite. Entre as soluções mais comuns e de fácil acesso, temos o hipoclorito de sódio diluído em água, na concentração entre dois a três por cento.

Na pesquisa realizada por Vasconcelos *et al.* (2010), mostra que o número de *S. mutans* na saliva de pacientes com higiene deficiente foi cerca de dez vezes maior do que em pacientes com boa higiene. Isso revela que, além de todas as variáveis já citadas, essa condição se configura como um fator de extrema importância no estabelecimento ou não da estomatite. A dificuldade, contudo, está em prever até que ponto a higiene da prótese, isoladamente, exerce influência sobre a permanência da infecção.

Barbieri *et al.* (2007) destacam que tanto na prevenção como no tratamento da estomatite, o procedimento mais eficaz é o controle do biofilme, o qual é alcançado através de medidas físicas ou químicas de contenção. Quando isso não for possível, deve ser realizada a substituição da prótese, tanto que Pereira-Cenci (2008) afirma que esse material pode ser fonte de microrganismos, o que resulta numa reinfecção. Uma das principais características da *Candida* é sua elevada resistência aos antimicrobianos. Alguns possíveis fatores podem estar associados a isso, como: incapacidade das drogas antifúngicas em penetrar na matriz do biofilme; alterações fenotípicas; indução da expressão de genes de resistência pelo fungo; e persistência de algumas células após o tratamento (MELO, GUERRA, 2014).

Na concepção de Pereira-Cenci *et al.* (2008), as bactérias fornecem aos fungos produtos metabólicos que ativam fatores de virulência, bem como o inverso também se aplica. A interação entre esses microrganismos modula a resposta do hospedeiro, desencadeando o processo inflamatório e colaborando para manter uma microbiota equilibrada dentro do biofilme.

Monroy *et al.* (2005) pesquisaram 105 usuários de prótese, com e sem lesão, e puderam constatar que o pH salivar era mais baixo em pacientes com estomatite por prótese, sendo colonizados por *C. albicans*, *S. mutans* e *S. aureus*. Segundo Salerno *et al.* (2011), valores de pH baixos são importantes tanto na adesão quanto na produção de fatores de virulência; pH em torno de 3, por exemplo, facilita a atividade enzimática de proteinases e lipases.

Para Melo e Guerra (2014) a escolha do tratamento adequado, é importante considerar, também, o aspecto social. A tomada de decisão sobre esse aspecto, deve levar em conta a opinião do paciente. Esses autores defendem que a escolha

do tratamento seja direcionada pela medicina e baseada em evidências, cujo objetivo é colocar em discussão fatores sociais, individuais e epidemiológicos para a tomada de decisão. Além disso, é notório que somente com a participação efetiva do usuário, será possível prevenir tratamentos futuros.

Penha *et al.* (2000) avaliaram pacientes edentados com e sem prótese, observando a incidência das espécies de *Candida* isoladas em cada grupo, bem como os níveis de proteinases e fosfolipases encontrados na saliva. Foram avaliados 69 pacientes, divididos em dois grupos: pacientes com estomatite por prótese (n=49) e pacientes sem a lesão (n=20). Os resultados indicaram *C. albicans* como a espécie mais comum em ambos os grupos, sendo mais prevalente no grupo de pacientes com lesão. Para a análise dos níveis de proteinases e fosfolipases, a avaliação enzimática foi realizada somente para *C. albicans*. Todas as amostras produziram proteinases e 83,3% delas produziram fosfolipases, indicando que somente a produção enzimática determina o desenvolvimento da doença. Após 24 horas em contato com a solução dos extratos, foi feita a contagem do número de larvas vivas e os dados foram tabulados (MELO, GUERRA, 2014).

De acordo com NGUTA *et al.* (2011), tanto extratos orgânicos, quanto extratos aquosos com valores de CL50 menores que 100 µg/ml apresentam alta toxicidade, CL50 entre 100 e 500 µg/ml apresentam toxicidade moderada, CL50 entre de 500 e 1000 µg/mL apresentam fraca toxicidade e CL50 acima de 1000 µg/mL são considerados atóxicos (não tóxicos).

Segundo Mímica *et al.*, (2009), estudos na América do Norte e Europa apontam *C. glabrata* como a principal espécie não-*albicans* envolvida em infecções; no Brasil, *C. tropicalis* tem ocupado essa colocação.

Segundo Newman e Cragg (2012) nos últimos 30 anos os produtos naturais de uma forma ou de outra continuam a desempenhar papel fundamental na descoberta de novos fármacos ou no desenvolvimento de novas estruturas. Também demonstraram que ainda em 2010 o campo dos produtos naturais foi responsável em cerca de 50% das aprovações de novas moléculas ativas, sendo que a metade das moléculas aprovadas seria diretamente obtida dos produtos naturais sem qualquer modificação.

7 - CONCLUSÃO

Todos os extratos demonstraram satisfatória ação antifúngica frente aos microrganismos testados.

A microscopia eletrônica de varredura foi fundamental para observar as alterações morfológicas diversas nas células em todas as linhagens de cândida.

O extrato de *Byrsonima intermedia* demonstrou ser o mais promissor.

A toxicidade celular frente a linhagens de fibroblasto murinho (L929) e queratinócito humano (HACAT) apresentou-se baixa.

Os resultados demonstraram que todos os extratos avaliados neste estudo foram considerados tóxicos nos ensaios *in vitro* frente à *Artemia salina* Leach.

As plantas medicinais são fonte de moléculas e/ou extratos possivelmente úteis para emprego na terapêutica contra a candidíase.

Os resultados obtidos neste trabalho apontam o potencial antifúngico das espécies, porém a condução de outros estudos é necessária visando possíveis aplicações terapêuticas.

9 - REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, A. C. Saliva and oral health. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 56, n. 1, 2010.
- ALIYU, O. M.; AWOPETU, J. A. Multivariate Analysis of Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Germplasm in Nigeria. **Silvae Genetica.**, v.56, p.3–4, 2007.
- ALMEIDA, A. S. Qualidade, compostos bioativos e atividade antioxidante total de pendúculos de cajuzeiros e frutos de umbuzeiros nativos do semi – árido do Piauí. 186f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Semi – Árido, Mossoró, 2009.
- ANDRADE, I. M. de, *et al.* Diversidade de Fanerógamas do Delta do Parnaíba – Litoral Piauiense. In: GUZZI, A. Biodiversidade do Delta do Parnaíba: litoral piauiense. Parnaíba: EDUFP, 2012.
- ANDERSON, W. R. Floral conservatism in neotropical Malpighiaceae. **Biotropica**, v. 11, p. 219-223, 1979.
- ANDRÉ, R. F. G., ANDRADE I. M., SILVA-LOVATO, C. H., PARANHOS, H. F. O., PIMENTA, F. C., ITO, I. Y. Prevalence of *Mutans Streptococci* Isolated from Complete Dentures and Their Susceptibility to Mouth rinses. **Braz. Dent. Journal**, Ribeiro Prato, v. 22, n.1, p. 62-67. 2011.
- AGUIAR, R. M., DAVID, J. P., DAVID, J. M. Unusual naphthoquinones, catching and triterpene from *Byronism microphylla*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2388-2392, 2005.
- AGRA, M. de F. *et al.* Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.
- AVRELLA, D., GOULART, L.S. Isolamento de *Candida* spp. Da mucosa oral de pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico. **Rev. Bras. Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 3, p. 205-207, 2008.
- APARNA, M. S., YADAV, S. Biofilms: microbes and disease. **Bras. J. Infect. Dis.**, Salvador, v. 12, n. 6, p. 526-530, 2008.
- BARROS, L. M.; CRISÓSTOMO, J. R.. Melhoramento genético do cajueiro.

- In: ARÁUJO, J. P. P. de; SILVA, V. V. Embrapa: Brasília. Cajucultura, modernas técnicas de produção, p. 73-96. 1995.
- BARROS, L. M., PAIVA, J. R., CAVALCANTI, J. J. V. Recursos genéticos de cajueiro: situação atual e estratégias para o futuro. In: QUEIROZ M. A.; GOEDERT C. O.; RAMOS S. R. R. Embrapa: Petrolina. Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro, p. 1–22. 1999.
 - BERGER, T. G. Distúrbios dermatológicos. In: Organizadores. MCPHEE. S. J., PAPADAKIS, M. A., RABOW. M. W.; Tradução: FONSECA. A. V., *et.al.* **CURRENT medicina: diagnóstico e tratamento**. 51. ed. Porto Alegre: AMGH Cap. 6:89–155. 2013.
 - BARBIERI, D. S. V.; VICENTE, V. A.; FRAIZ, F. C.; LAVORANTI, O. J.; SVIDZINSKI, T. I. E.; PINHEIRO, R. L. Analysis of the *in vitro* adherence of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 624-631, 2007.
 - BÔAS, G. de K. V., GADELHA, C. A. G. Oportunidades na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional. **Cad. saúde pública**, v. 23, n. 6, p. 1463-1471, 2007.
 - BONOMINI, T. J. Padronização de metodologia para extração do fitoconstituente majoritário das flores de *Allamanda catártica* L. (APOCYNACEAE). Dissertação submetida à Universidade do Vale do Itajaí como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas. 2013.
 - BOATTO, H. F., MORAES, M. S., MACHADO, A. P., GIRÃO, M. J. B. C., FISCHMAN, O. Correlação entre os resultados laboratoriais e os sinais e sintomas clínicos das pacientes com candidíase vulvovaginal e relevância dos parceiros sexuais na manutenção da infecção em São Paulo. **Rev Bras de Ginecol e Obst.** Rio de Janeiro. 29(2):80-84.2007.
 - BORGES, A. N. C. Caracterização genética em germoplasma de cajú (*Anacardium spp.*) por meio de marcadores morfoagronômicos e moleculares ISSR, Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento. 2015.

- CASTRO, R. M. Flora da Bahia–Moraceae. Mestrado. Feira de Santana, BA: Universidade Estadual de Feira de Santana, 2006.
- CELEGHINI, R. M. S.; YARIWAKE, J. H.; LANÇAS, F. M. Otimização das condições de extração hidroalcoólica das furanocumarinas de *Dorstenia brasiliensis* Lam. por maceração com ultra-som e análise quantitativa por CLAE/UV e fluorescência. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, p. 61-66, 2007.
- CARBAJAL, A. C. R.; SILVA JÚNIOR, N. Sebrae-CE/Embrapa, Fortaleza. Castanha de caju: recomendações práticas para a melhoria da qualidade. **Agroindústria Tropical**, 16p. 2003.
- CHORILLI, M., TAMASCIA, P., ROSSIM, C., SALGADO, H. R. N. Ensaio biológicos para avaliação de segurança de produtos cosméticos. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**; v.30, n1, p.19-30, 2009.
- COUTO, A. G., SILVA, R. M., VITORINO, J. C. Tecnologia e garantia da qualidade de fitoterápicos. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. *Fármacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar*. São Paulo: Santos. p. 241-308. 2010.
- DA SILVA, F. de C. Capítulo 10: A mata é sua Farmácia. **Revista Virtual de Química**, p. 120-129, 2013.
- D'AVILA, S. Avaliação clínica e laboratorial da estomatite por prótese. 2006. 153f. Tese (Doutorado em Reabilitação Oral – Área de Prótese) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia. Araraquara, 2006.
- DE AZEVEDO, C. L., DA SILVA, L. H. P., STÁBELI, R. G. Biodiversidade, infraestrutura universitária e burocracia: os desafios da pesquisa bioprospectiva visando o desenvolvimento sustentado da amazônica legal. **Revista de Estudos Universitários**, v. 36, n. 3, 2010.
- DE TOLEDO, CLEYTON, E. M. *et al.* Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachaça as extractor liquid. **Journal of ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 420-425, 2011.
- DE ROSSI, T., LOZOVY, M. A. B., SILVA, R. V., FERNANDES, E. V., GERALDINO, T. H., COSTA, I. C., SARIDAKIS, H. O., WATANABE, M. A. E., FELIPE, I. Interações entre *Candida albicans* e Hospedeiro. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v. 32, n. 1, p. 15-28, 2011.

- DERENGOWSKI, L. S. Caracterização da resposta de fungos patogênicos a diferentes condições de interação intra e inter-domínios. 176f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2011.
- DONGARI-BAGTZOGLU, A., KASHLEVA, H., DWIVEDI, P., DIAZ P., VASILAKOS, J. Characterization of Mucosal *Candida albicans* Biofilms. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 4, n.11, p. 67-70, 2009.
- DUTRA, R. C., CAMPOS, M. M., SANTOS, A. R. S., CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacol Res* (2016).
- ELGUEZABAL, N., MAZA, J. L., DORRONSORO, S., PONTÓN, J. Whole Saliva has a Dual Role on the Adherence of *Candida albicans* to Polymethylmetacrylate. **The Open Dentistry Journal**, v. 2, n. 1, p. 1-4, 2008.
- EMBRAPA MEIO-NORTE. Cajuí: Potencial para a agroindústria familiar. **Encarte técnico**. Teresina, ano 4, n.12, Out./Nov./Dez., p. 5. 2002.
- FAVALESSA, O. C.; MARTINS, M. A.; HAHN, R. C. Aspectos micológicos e suscetibilidade *in vitro* de leveduras do gênero *Candida* em pacientes HIV-positivos provenientes do Estado de Mato Grosso. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 43, n. 6, p.673-677, 2010.
- FELÍCIO, J. D. *et al.* Triterpenos isolados das folhas de três espécies de *Byrsonima*. **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 62, p. 91-92, 1995.
- FENNER, R., BETTI, A. H., MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** v.42, n.3, p.369-394, 2006.
- FERREIRA, S. B., DANTAS, I. C., CATÃO, R. M. R. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de sucupira (*Pterodon emarginatus* Vogel). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.16, n.2, p.225-230, 2014.
- FERRETI, A. R., KAGEYAMA, P. Y., ARBOEZ, G. F., SANTOS, J. D., BARROS, M., LORZA, R. F. OLIVEIRA, C. 1995. Classificação das espécies arbóreas em grupos ecológicos para revegetação no estado de São Paulo. **Florestar Estatístico** v.3, n.7, p.2-6.
- FERRI, M. G. Plantas do Brasil – espécies do cerrado. São Paulo: **Edgard Blücher**. 239 p.1969.

- FREITAS, B. M., PAXTON, R. J. A comparison of two pollinators: the introduced honey bee *Apis mellifera* and an indigenous bee *Centris tarsata* on cashew *Anacardium occidentale* in its native range of NE Brazil. **Journal of Applied Ecology**, v.35, p.109-121, 1998.
- FREITAS, B. M., PAXTON, R. J.; HOLANDA-NETO, J. P. Identifying Pollinators Among an Array of Flower Visitors, and the Case of Inadequate Cashew Pollination in NE Brazil. In: KEVAN P.; IMPERATRIZ-FONSECA V. L. (Eds.). *Pollinating Bees-The Conservation Link Between Agriculture and Nature*. Brasília: Ministry of Environment. p.229-244, 2002.
- GABLER, I. G., BARBOSA, A. C., VILELA, R. R., LYON, S., ROSA, C. A. Incidence and Anatomic Localization of Oral Candidiasis in Patients with Aids Hospitalized in a Public Hospital in Belo Horizonte, MG, Brazil. **J. Appl. Oral Sci.**, Belo Horizonte, v. 16, n.4, p. 247-250, 2008.
- GASPAROTO, T. H., DIONÍSIO, T. J., OLIVEIRA, C. E., PORTO, V. C., GELAN, V., SANTOS, C. F., CAMPANELLI, A. P., LARA, V. S. Isolation of *Candida dubliniensis* from denture wearers. **Journal of Medical Microbiology**, Bauru, v. 58, n. 7, p. 959–962, 2009.
- GALUPPO, S. C., COHEN, K. O., KANASHIRO, M. A utilização do amapá-doce (*Brosimum parinarioides Ducke*), na comunidade de Piquiatuba, Belterra-PA. In: Embrapa Amazônia Oriental-Resumo em anais de congresso (ALICE). In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 54.; REUNIÃO AMAZÔNICA DE BOTÂNICA, 3. Belém, PA. 2003.
- GIOLO, M. P., SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patol e Med Laborat**, Rio de Janeiro. 46:225-34. 2010.
- GOMES, S. O. *et al.* Características físicas e químicas de frutos de cajuí (*Anacardium ssp.*). In: Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas. Gurapari, 2009.
- GOMES, S. O., SOUZA, V. A. B. S. de, COSTA, M. do P. S. D., SILVA, C. C. P. da; VALE, E. de M., SOUSA, M. de, SOUSA, J. P. de B. Avaliação da qualidade física e química de cajuí (*Anacardium spp.*) na região Meio-Norte. **Geintec**, v.3, p.139-145, 2013.

- GOMPERTZ, O. F. *et al.* Micoses Oportunisticas e Outras Micoses. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Org.) **Microbiologia**. 5. Ed. São Paulo: Atheneu. Cap. 70, p. 525-530. 2008.
- GUANZIROLI, C. E., BASCO, C., SABOYA, A., SOUZA FILHO, H. M. Entraves ao Desenvolvimento da Cajucultura no Nordeste: margens de comercialização ou aumentos de economias de escala? **Extensão Rural**, v. 16, p. 96-122, 2009.
- GUSMÃO, J. M. R. Leveduras do gênero *Candida* na saliva de usuários de prótese parcial removível a grampo. 2007. 76f. Dissertação (Mestrado em Prótese Dentária) – Universidade de Taubaté, Taubaté, 2007.
- GUIMARÃES, M. C. Frugivoria por aves em *Tapirira guianensis* (*Anacardiaceae*) na zona urbana do município de Araruama, Estado do Rio de Janeiro, sudeste brasileiro. **Atualidades Ornitológicas** 116:12. 2003.
- HARVEY, ALAN, L. Natural products in drug discovery. **Drug discovery today**, v. 13, n. 19, p. 894-901, 2008.
- HIRUMA-LIMA, Clélia Akiko *et al.*. The anti-ulcerogenic effects of *Curatella americana* L. **Journal of ethnopharmacology**, v. 121, n. 3, p. 425-432, 2009.
- HOLANDA, A. A. R. D., FERNANDES, A. C. S., BEZERRA, C. M., FERREIRA, M. A. F., HOLANDA, M. R. R., HOLANDA, J. C. P. Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. **Rev Bras de Ginecol e Obst.**, Rio de Janeiro. 29:3-9. 2007.
- JOLY, A. B. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. 4.ed. São Paulo: Nacional, 778p. 1977.
- KAGEYAMA, P., GANDARA, F. B. Revegetação de áreas ciliares. In Rodrigues, R. R., LEITÃO-FILHO, H. F. (eds.) *Matas ciliares: conservação e recuperação*. Editora Universidade de São Paulo-USP, São Paulo, Brasil, p. 1-40. 2000.
- KHAN, M. A. *et al.* Mohammed Asif Khan *et al.*, *Candida albicans* Growth on Soft Denture Reliner: In Vitro Study. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. Feb, v.10, n.2, ZC42-ZC4542 42. 2016.
- KINGSTON, D. G. I. Modern natural products drug Discovery and its relevance to biodiversity conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 496-511, 2011.

- KRÜGEL, M. M.; BERH, E. R. Utilização dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) por aves no parque do Ingá, Maringá, Paraná. **Revista Biociências** v.2, p.47-56, 1998.
- LIU, Y., ZHOU, J. L., LIU, P., SUN, S. L. I. P. Chemical markers fishing and knockout for holistic activity and interaction evaluation of the componentes in herbal medicines. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 5239-5245, 2010.
- MANGUEIRA, D. F. B., MANGUEIRA, L. F. B., DINIZ, M. DE F. F. M. Candidose Oral. Oral Candidosis. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. v.14, n.2, p.69-72, 2010. DOI:10.4034/RBCS.2010.14.02.09. ISSN 1415-2177. <http://periodicos.ufpb.br/ojs2/index.php/rbcs>.
- MARTINS, V. J. M.; LINS, R. X.; BERLINCK, T. C. A.; FIDEL, R. A. S. Cytotoxicity of root canal sealers on endothelial cell cultures. **Braz Dent J**; v,24, n.1, p.15-20, 2013.
- MARREIRO, R. DE O., BANDEIRA, M. F. C. L., DE ALMEIDA, M. C., COELHO, C. N., VENÂNCIO, G. N., CONDE, N. C. O. Avaliação da citotoxicidade de um enxaguatório bucal contendo extrato de *Libidibia férrea*. **Brazilian Research in Pediatric Dentistry and Integrated Clinic**. v. 14, (Supl.3), p.34-42. DOI: <http://dx.doi.org/10.4034/PBOCI.2014.14s3.04> ISSN 1519-0501.
- MATTIETTO, R. de A. *et al.* Otimização do processo de conservação do leite de amapádoce (*Brosimum parinarioides* Ducke). In: Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: CONFERÊNCIA DO SUBPROGRAMA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA-SPC&T FASE II/PPG7, 2008, Belém, PA. Anais... Brasília, DF: CNPq, 2009.
- MENDONÇA-SOUZA, L. R. *Ficus* (Moraceae) no estado de São Paulo. Mestrado. São Paulo, SP: Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2006.
- MITCHELL, J. D. The poisonous *Anacardiaceae* genera of the world. **Advances in Economy Botany** v,8, p.103-129, 1990.
- MOEINTAGHAVI, A., Berberine gel in periodontal inflammation: clinical and histological effects. **J Periodontol Implant Dent**. v.4, n.1, p:7–11, 2012.

- MÍMICA, L. M. J., UEDA, S. M. Y., MARTINO, M. D. V., NAVARINI, A., MARTINI, I. J. Diagnóstico de infecção por *Candida*: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 1, p. 17-23, 2009.
- MITCHELL, J. O., MORI, S. A. The cashew and its relatives (*Anacardium occidentale* L.). **Memoirs of the New York Botanical Garden.**, v. 42, n.1, p. 1- 76, 1987.
- NETO, M. M., DANESI, C. C., UNFER, D. T. Candidíase Bucal: Revisão da Literatura. *Saúde*, Rio Grande do Sul, v. 31, n.1- 2, p.16-26, 2005.
- NETT, J. E., MARCHILLO, K., SPIEGEL, C. A., ANDES, D. R. Development and validation of an *in vivo Candida albicans* Biofilm Denture Model. **Infection and Immunity**, Madison, v. 78, n. 9, p. 3650–3659, 2010.
- OLAOKUN, Oyinlola O. *et al.*. Evaluation of the inhibition of carbohydrate hydrolysing enzymes, antioxidant activity and polyphenolic content of extracts of ten African Ficus species (Moraceae) used traditionally to treat diabetes. *BMC Complementary and Alternative medicine*, v. 13, n. 1, p. 94, 2013.
- OLIVEIRA, C. E. *Candida albicans* e estomatite por dentadura: avaliação da presença do fungo na lesão, na prótese total superior e no sangue. 79f. Dissertação (Mestrado Odontologia – área de Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Bauru, 2009.
- PACHU, C. O. Processamento de plantas medicinais para obtenção de extratos secos e líquidos. Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Engenharia de Processos da Universidade Federal de Campina Grande como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Doutora em Engenharia de Processos. Campina Grande – Paraíba Junho/2007.
- PALHETA, R. A., TEIXEIRA, L. S., TEIXEIRA, MFS. Atividade da protease, qualidade microbiológica e atividade antioxidante do látex de *Brosimum parinarioides*. REUNIÃO ANUAL SBPC, v. 61, 2009.
- PAULINO, F. D. G. Polinização entomórfila em cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) no litoral de Pacajus – CE. 70f. Dissertação (mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São

Paulo, Piracicaba, 1992.

- PEREDA, G. A. O. Avaliação do desenvolvimento das espécies de *Candida spp.* em biofilmes pré-formados por espécies de *Streptococcus spp.* E *Staphylococcus aureus* e sua inibição pela atividade antifúngica de extratos vegetais. 2007. 81f. Dissertação (Mestrado em Biologia Oral) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, 2007.
- PEREIRA-CENCI, T. Avaliação da formação de biofilme de espécies de *Candida* sobre a superfície de resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses removíveis. 101f. Tese (Doutorado em Clínica Odontológica – área de Prótese Dentária) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Piracicaba, 2008.
- PELL, S. K., MITCHELL, J. D., MILLER, A. J. & LOBOVA, T. A. Anacardiaceae. In K. Kubitzki (Ed.) The families and genera of vascular plants. X. Flowering plants. Eudicots. Sapindales, Curcubitales, Myrtales. **Springer**, Berlin, p. 7- 50. 2011.
- PIMENTEL, G. *Fruticultura brasileira*. São Paulo: Livraria Nobel, 2005.
- PRABHADEVI, V., SATHISH, S. S., JOHNSON, M., VENKATRAMANI, B., JANAKIRAMAN, N. Phytochemical studies on *Allamanda catártica* L. using GC-MS. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, p. S550-S554, 2012.
- QUADROS, D. S., NUNOMURA, S. M., NUNOMURA, R. C. S. Atividade antioxidante da espécie *Brosimum parinarioides*. Resumo apresentado em congresso – SBQ, 2002, Disponível em <http://sec.s bq.org.br/cdrom/31ra/resumos/T1101- 1.pdf>, Acessado em 18 nov. 2015.
- RAMADAN, M. A. *et al.*. Chemical composition of the stem bark and leaves of *Ficus pandurata* Hance. **Natural product research**, v. 23, n. 13, p. 1218-1230, 2009.
- REGEZI, J. A., SCIUBBA, J. J. Patologia Bucal - Correlações Clínico patológicas. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.0-25; 0-35; 76-80; 101. 2000.

- RODRIGUES, C. M. *et al.* High-Performance liquid Chromatographic Separation and Identification of Polyphenolic Compounds from the Infusion of *Davilla elliptica* St. Hill. **Phytochemical Analysis**, v. 19, n. 1. 17-24, 2008.
- RUFINO, M. S. M. Qualidade e potencial de utilização de cajuís (*Anacardium* spp.) oriundos da vegetação litorânea do Piauí. 2004. 92 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2004.
- RUFINO, M. S. M.; CORRÊA, M. P. F.; ALVES, R. E.; BARROS, L. M.; LEITE, L. A.S. Embrapa Agroindústria Tropical. Suporte tecnológico para a exploração racional do cajuzeiro. Fortaleza, p.30. 2007.
- RUFINO, M. S. M., CORRÊA, M. P. F., ALVES, R. E., LEITE, L. A. S. Utilização atual do cajuí nativo da vegetação litorânea do Piauí, Brasil. **Proceedings of the Tropical Region - American Society for Horticultural Science**, v.52, p.147-149, 2008.
- SALERNO, C., PASCALE, M., CONTALDO, M., ESPOSITO, V., BUSCIOLANO, M., MILILLO, L., GUIDA, A., PETRUZZI, M., SERPICO, R. *Candida*-associated denture stomatitis. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**. Valencia, v.16, n. 2, p. 139-143, 2011.
- SANTOS, S. K. D., GOMES, L. P., SOUZA, L. E. C., WALDSCHMIDT, A. M. Visitantes florais do caju anão precoce (*Anacardium occidentale* L.) em uma área de caatinga no município de Jequié – BA. In: Congresso de Ecologia do Brasil. Caxambu, 2007.
- SHELBURNE, A. S., HAMIL, R. J. Infecções micóticas. In: Organizadores. MCPHEE. S. J., PAPADAKIS, M. A., RABOW. M. W.; Tradução: FONSECA. A. V., *et.al.* CURRENT medicina: diagnóstico e tratamento. 51. ed. Porto Alegre: AMGH. 8:212-13 / 36:1429-41. 2013.
- SILVA, J. A. da; SILVA, D. B. da; JUNQUEIRA, N. T. V.; ANDRADE, L. R. M de. Embrapa: Planaltina. Coleta de sementes, produção de mudas e plantio de espécies frutíferas nativas dos cerrados: informações exploratórias. Planaltina, 1992.
- SILVA-LUZ, C.L., PIRANI, J.R. *Anacardiaceae*. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Rio de Janeiro, 2014.

- SIMONETTI, E., ETHUR, M. E., CASTRO, L. C., KAUFFMANN, C., GIACOMIN, A. C., LEDUR, A., AROSSI, K., PACHECO, L. A., GOETTERT, M. I., FALEIRO, D., FREITAS, E. M. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.18, n.1, p.9-18, 2016.
- SINGH, N., SAVITA, S., RITESH, K., SHIVANAND, S. *Phytotherapy*: a novel approach for treating periodontal disease. **J Pharm Biomed Sci**; v.06, n.04, p.205–210, 2016.
- SILVA-LUZ, C. L. & PIRANI, J.R. Anacardiaceae. In R.C. Forzza *et al.* (org.) *Catálogo de plantas e fungos do Brasil*. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 1, p. 599-602.2010.
- SILVA, H. F., MARTINS-FILHO, P. R. S., PIVA, M. R. Denture-related oral mucosal lesions among farmers in a semi-arid Northeastern Region of Brazil. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, Valencia, v. 16, n. 6, p. 740-744, 2011.
- SIQUEIRA, A. B. S., RODRIGUEZ, L. R. N. A.; SANTOS, R. K. B; MARINHO, R. R. B., ABREU, S., PEIXOTO, R. F., GURGEL, B. C. V. Antifungal activity of propolis against *Candida* species isolated from cases of chronic periodontitis. **Braz Oral Res** [online], v.29, n.1, p.1-6, 2015.
- SHAFER, W. G., HINE, M. K., LEVY, B. M. Tratado de Patologia Bucal. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987. p.363-7.
- SOUTO, L. S., OLIVEIRA, D. M. T. Fruto e semente de *Byrsonima intermédia*. **Revista Brasil. Bot.**, v.28, n.4, p.697-712, out.-dez. 2005a.
- SOUTO. S. L., OLIVEIRA, T. M. D. Morfoanatomia e ontogênese do fruto e semente de *Byrsonima intermedia* A. Jus (Malpighiaceae). **Revista Brasil, Botucatu**, v.28, n.4.p.697-712, 2005b.
- TAVARES, G. R. Correlação entre Diagnóstico Clínico, Histopatológico e Micológico de lesões bucais em portadores de próteses dentárias. 63f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – área Estomatologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.
- TERRAZAS, T. Anatomía de la madera de Anacardiaceae con énfasis en los géneros americanos. **Boletín de la Sociedad Botánica de México** v,64, p.103-109, 1999.

- TORRES, S. R. *et al.* A prospective randomized trial to reduce oral *Candida* spp. colonization in patients with hyposalivation. **Braz. Oral Res.**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 2, p. 182-187, 2007.
- VASCONCELOS, L. C. S., SAMPAIO, F. C., SAMPAIO, M. C. C., PEREIRA, M. S. V., PEIXOTO, M. H. P. *Streptococcus mutans* in denture stomatitis patient under antifungal therapy. **Rev. Odonto. Ciência**, João Pessoa, v. 25, n. 21, p. 120-125, 2010.
- VILAR, Juliana Brandstetter *et al.*. Assessment of genotoxicity and cytotoxicity of "lixreira" (*Curatella Americana* L.) λ using the prophage induction test (SOS inductest). **Braz. J. Pharm. Sci.**, São Paulo, v. 45, n. 3, p. 491-496, Sept. 2009.
- WINGETER, M. A., GUILHERMETTI, E., SHINOBU, C. S., TAKAKI, I., SVIDZINSKI T. I. S. Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 40, n. 3, 2007.
- ZIMMERMANN, J. B., PAIVA, A. O., COSTA, A. C. S., SOUZA, A. M. G. V., CHAGAS, A. R., LIMA, A. A. C. Validade do diagnóstico clínico de candidíase vulvovaginal. **HU Rev, Juiz de Fora.** v.5, n.1, p.11-18, 2009.