

Prospecção antifúngica em *Agonandra brasiliensis*

Antifungal prospecting in *Agonandra brasiliensis*

Letícia Silveira Goulart^{1*}, Helder Lopes Teles², Vanessa Alves Mendes¹, Marizete Cavalcante de Souza Vieira², Selma Vieira de Moura¹, Júlia de Lima Ramon¹, Jacqueline Marques Souza¹, José Cavalcante Souza Vieira² & Érica Pereira de Campos²

¹ Curso de Enfermagem, Instituto de Ciências Exatas e Naturais - ICEN, Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT, Campus de Rondonópolis, Mato Grosso, MT, Brasil.

² Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Naturais - ICEN, Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT, Campus de Rondonópolis, Mato Grosso, MT, Brasil.

RESUMO

O presente estudo avaliou a ação antifúngica de *Agonandra brasiliensis* Miers ex Benth. & Hook. F. Foram testados os extratos hidrometanólicos e dicloroetanólicos das folhas e cascas, bem como as partições hexânica, diclorometânica e hidrometanólica frente a espécies de *Candida* e *Cryptococcus*. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, sendo avaliadas as concentrações de 1200, 600, 300, 150 e 75 µg/mL.

O extrato hidrometanólico das cascas inibiu o crescimento de *C. tropicalis* (CIM=300 µg/mL), *C. dubliniensis* (CIM=300 µg/mL), *C. neoformans* (CIM=300 µg/mL) e *C. gattii* (CIM=600 µg/mL). As partições hexânicas das folhas e das cascas foram ativas contra *C. krusei* (CIM=600 µg/mL), *C. tropicalis* (CIM=150 µg/mL), *C. parapsilosis* (CIM=300 µg/mL) e *C. dubliniensis* (CIM=150 µg/mL). A partição hidrometanólica das cascas foi ativa sobre *C. krusei* (CIM=300 µg/mL) e *C. tropicalis* (CIM=300 µg/mL). Estudos futuros que busquem isolar e identificar os princípios ativos presentes em *A. brasiliensis* devem ser realizados, sobretudo voltados para as partições hexânicas que apresentaram a melhor atividade, com CIM de 150 µg/mL para *C. tropicalis* e *C. dubliniensis*.

Palavras-chave: Leveduras, Plantas medicinais, atividade antimicrobiana

ABSTRACT

The present study evaluated the antifungal activity of *Agonandra brasiliensis* Miers ex Benth. & Hook. F. The hydromethanolic and dichloroethanolic extracts from leaves and barks, as well as, hexanic, dichloromethanic and hydroalcoholic partitions were tested against *Candida* and *Cryptococcus* species. The minimal inhibitory concentration (MIC) of the extracts was evaluated by the microdilution method, being assessed values of 1200, 600, 300, 150 and 75 µg/mL. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values were calculated as the lowest concentration of the test samples which shows complete growth inhibition of the fungi strains. The hydromethanolic extract from barks inhibited growth to *C. tropicalis* (MIC=300 µg/mL), *C. dubliniensis* (MIC=300 µg/mL), *C. neoformans* (MIC=300 µg/mL) e *C. gattii* (MIC=600 µg/mL). The hexanic fractions from leaves and barks were actives to *C. krusei* (MIC=600 µg/mL), *C. tropicalis* (MIC=150 µg/mL), *C. parapsilosis* (MIC=300 µg/mL) and *C. dubliniensis* (MIC=150 µg/mL). The hydromethanolic fractions from steam showed activity against *C. krusei* (MIC=300 µg/mL) and *C. tropicalis* (MIC=300 µg/mL). Future studies to isolate and identify the active principles in *A. brasiliensis* should be conducted, mainly focused on the hexanic partitions that showed the best activity with a MIC of 150 mg/mL for *C. tropicalis* and *C. dubliniensis*.

Keywords: Yeasts, Medicinal plants, antimicrobial action

* **Autor Correspondente:** Letícia S. Goulart. Rodovia Rondonópolis/Guiratinga Km 06, Rondonópolis, MT. Telefone: (66) 3410-4093. Fax: (66) 3410-4092. E-mail: lgoulart77@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

O Cerrado brasileiro apresenta uma Flora diversificada com inúmeras potencialidades, dentre as quais se destacam as plantas com ação medicinal (Conceição *et al.*, 2011; Almeida *et al.*, 1998). Espécies como *Pterodon emarginatus* (sucupira-branca), *Stryphodendron barbatiman* (barbatimão), *Schinus terebinthifolius* (aroeira da mata), *Kielmeyera coriacea* (pau-santo) são usadas na medicina popular em doenças inflamatórias, como reumatismo e em doenças tropicais como infecções fúngicas, bacterianas, esquistossomose, leishmaniose e malária (Almeida *et al.*, 1998).

Agonandra brasiliensis Miers ex Benth. & Hook. F. é uma espécie comum do bioma Cerrado, pertencente à família Opiliaceae, sendo conhecida popularmente como cerveja-de-pobre, pau-marfim, quina-de-veado entre outros. Esta planta ocorre no Cerrado sentido restrito e cerrado nos Estados do Acre, Amazonas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí, Rondônia, Roraima, São Paulo, também no Distrito Federal (Silva Júnior, 2005). Na medicina popular suas folhas são empregadas em banhos para tratar reumatismo e o óleo extraído da semente e da casca são indicados para cicatrização e tratamento de bronquite respectivamente (Almeida *et al.*, 1998; Silva Júnior, 2005; Conceição *et al.*, 2011). As cascas são utilizadas na forma de decocto ou infusão para tratar hipercolesterolemia, febre, tosse e gripe (Nascimento & Conceição, 2011).

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das indicações terapêuticas dos vegetais, apesar de muitos destes não terem seus constituintes químicos conhecidos. De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos multidisciplinares, os quais podem envolver áreas como botânica, farmacologia e fitoquímica (Maciel *et al.*, 2002). Neste sentido, as espécies vegetais do Cerrado tem sido alvo de várias pesquisas associadas a ações antioxidante (Roesler *et al.*, 2007), cicatrizante (Batista *et al.*, 2012), antiúlcera (Hiruma-Lima *et al.*, 2006), citotóxica (Mesquita *et al.*, 2009), antibacteriana (Pinho *et al.*, 2012) e antifúngica (Silva *et al.*, 2012).

A incidência de infecções fúngicas causadas por leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* aumentou nas últimas décadas, especialmente entre pacientes hospitalizados, transplantados e imunocomprometidos (Sidrim & Rocha, 2004). Embora *C. albicans* seja o principal fungo patogênico humano, as espécies não-*albicans* estão emergindo de forma significativa, entre elas *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis*. As manifestações clínicas da candidíase apresentam uma diversidade de quadros que variam desde formas mais superficiais, como a candidíase oral e vaginal, até quadros mais invasivos resultando em candidemia e infecção sistêmica (López-Martínez, 2010).

Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii* são leveduras agentes etiológicos da criptococose (Chaturvedi & Chaturvedi, 2011). Dependendo do sítio de infecção e do estado imune do paciente, as manifestações clínicas podem variar desde formas assintomáticas até formas severas que incluem pneumonia, meningite e infecção disseminada (Li & Mody, 2010; Chaturvedi & Chaturvedi, 2011). Infelizmente, as falhas no tratamento e índices de mortalidade para a criptococose ainda permanecem altos (Li & Mody, 2010).

Os produtos naturais representam uma fonte rica de compostos biologicamente ativos e são um exemplo de diversidade molecular com reconhecido potencial no descobrimento e desenvolvimento de fármacos, representando mais de 30% dos produtos farmacêuticos correntes (Mishira *et al.*, 2008). Muitas plantas terrestres e marinhas contêm metabólitos com ação antifúngica, o que favorece seu uso como alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos. Aproximadamente 80 metabólitos com ação sobre espécies de *Candida* foram identificados, entretanto, estes compostos não foram patenteados ou aprovados para o uso como fármacos, isto em parte pelo desconhecimento do mecanismo de ação, ineficácia na farmacocinética e farmacodinâmica, problemas na otimização da dose e natureza tóxica destas moléculas (Rajeshkumar & Sundararaman, 2012). Desta forma, se faz necessário, aprofundar os estudos etno-farmacológicos a fim de se melhor compreender o potencial terapêutico dos produtos de origem natural. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a ação antifúngica de extratos e frações das folhas e cascas de *Agonandra brasiliensis* Miers ex Benth. & Hook. F.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material botânico

Folhas e cascas de *Agonandra brasiliensis* Miers ex Benth. & Hook. F foram coletados na reserva do Horto Municipal de Rondonópolis, MT, em maio de 2010 (16°28'59.01"S; 54°38'14.53"O) e sua exsiccata foi depositada no Herbário Central da Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, com o número 39.175, identificada pela Profa. Dra. Érica Pereira de Campos, UFMT, Campus Rondonópolis.

Obtenção dos extratos e frações

O material vegetal constituído de folhas e cascas foi seco em estufa com ventilação a 45°C, pulverizado em moinho de facas e cada parte dividida em duas porções iguais (folhas: 2x 80g; cascas: 2x 150g), extraída por maceração estática em duas soluções diferentes: hidrometanólica (1:9 V/V) e em dicloroetanólica (7:3 V/V), em 3x600 mL filtradas em 48/48h e concentradas por evaporação em evaporador rotatório equipado com banho de aquecimento, ajustado a 40° C, sendo obtidas os extratos brutos: de folhas (21,20 g e 9,45 g) e de cascas (10,54 g e 9,92 g) respectivamente. Os extratos

brutos hidrometanólicos foram submetidos à partição líquido-líquido em gradiente crescente de polaridade, obtendo-se as frações: hexânica (0,17 g e 0,29 g), diclorometânica (1,17 g e 0,90 g) e hidrometanólica (6,96 g e 3,30 g) de folhas e cascas respectivamente, após eliminação do solvente.

Micro-organismos estudados

Foram utilizadas linhagens padrão provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC), sendo avaliadas *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida tropicalis* ATCC 25922, *Candida parapsilosis* ATCC 40058, *Candida dubliniensis* ATCC 10568, *Cryptococcus neoformans* ATCC 32264 e *Cryptococcus gattii* ATCC 32078. As leveduras foram cultivadas e mantidas em meio ágar Sabouraud no laboratório de Ciências Básicas do curso de Enfermagem, Campus de Rondonópolis da UFMT.

Avaliação da Atividade Antifúngica

A atividade antifúngica dos extratos vegetais foram determinadas através do método de microdiluição em caldo, conforme protocolo M27-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI - antigo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* - NCCLS). Uma suspensão das leveduras foram preparadas em solução salina estéril e ajustadas para uma densidade celular compatível ao tubo 0,5 da escala de McFarland. Esta suspensão foi diluída em 1:50, seguida por uma nova diluição de 1:20 em meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute médium*), a fim de se obter um inóculo com concentração de 1×10^3 a 5×10^3 UFC/mL. Os extratos e partições foram testados nas concentrações de 1200, 600, 300, 150 e 75 µg/mL e volumes de 100 µL da suspensão leveduriforme foram inoculados em microplacas contendo 100 µL de RPMI 1640 acrescido de diferentes concentrações dos extratos vegetais e as amostras, foram incubadas a 37 °C por 48 h, para os ensaios com *Candida* spp. e por 72 h nos testes com *Cryptococcus* spp. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento fúngico. O fluconazol foi utilizado como controle positivo, sendo testadas as concentrações de 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 e 64 µg/mL deste antifúngico conforme preconiza a norma M27-A2. Os testes foram realizados em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atualmente, existem muitos métodos destinados a avaliar a ação antimicrobiana de extratos vegetais, sendo os mais conhecidos os métodos de difusão em ágar, de macrodiluição e de microdiluição (Ostrosky *et al.*, 2008). Em nossos ensaios, a técnica de microdiluição em caldo mostrou uma ótima reprodutibilidade. A microdiluição também apresenta a vantagem de ser 30 vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura, requerer pequena quantidade de reagentes e permitir ser usada para um grande número de amostras (Ostrosky *et al.*, 2008).

Nos testes de avaliação de ação antimicrobiana, geralmente, são utilizados como controle positivo compostos antibacterianos ou antifúngicos específicos para cada microrganismo a ser testado. Nesta pesquisa, utilizamos o fluconazol, cujos valores de CIM estão representados na Tabela 1, entretanto, não há um consenso na literatura sobre quais valores de CIM devem ser aceitos para os extratos vegetais quando comparados ao controle. Desta forma, alguns autores só consideram como ativos, os extratos e partições que apresentarem valores de CIM inferior a 1000 µg/mL (Holetz *et al.*, 2002; Regasini *et al.*, 2010; Silva Júnior *et al.*, 2010). Baseados neste critério verificaram que dentre os extratos brutos testados, somente o extrato hidrometanólico das cascas de *A.brasiliensis* apresentou ação antifúngica, sendo ativo contra *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C.neoformans* e *C. gattii* (Tabela 1).

Tabela 1. Prospecção antifúngica dos extratos brutos dicloroetanólico e hidrometanólico das folhas e cascas de *A. brasiliensis* sobre espécies de *Candida* e de *Cryptococcus*.

Micro-organismos/Amostras	CIM (µg/mL)				
	1	2	3	4	5
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	*	*	*	*	8
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	*	*	*	*	4
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	*	*	*	*	32
<i>C. tropicalis</i> ATCC 25922	*	*	300	*	32
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 40058	*	*	*	*	4
<i>C. dubliniensis</i> ATCC 10568	*	*	300	*	1
<i>C.neoformans</i> ATCC 32264	*	*	300	*	2
<i>C. gattii</i> ATCC 32078	*	*	600	*	1

CIM: Concentração Inibitória Mínima, *: CIM > 1000 µg/mL, 1: extrato hidrometanólico das folhas, 2: extrato dicloroetanólico das folhas, 3: extrato hidrometanólico das cascas, 4: extrato dicloroetanólico das cascas, 5: fluconazol

A Tabela 2 apresenta os resultados dos ensaios com as frações hexânica, diclorometânica e hidrometanólica das folhas e cascas de *A. brasiliensis*. As partições hexânicas das folhas e das cascas inibiram o crescimento de *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis*, com valores de CIM que variaram de 150 a 600 µg/mL. A fração hidrometanólica das cascas apresentou ação antifúngica sobre *C. krusei* (CIM = 300 µg/mL) e *C. tropicalis* (CIM = 150 µg/mL). As demais partições não inibiram o crescimento fúngico. Vale ressaltar que os fatores importantes como a técnica de avaliação antimicrobiana utilizada, o meio de crescimento, o microrganismo, o material botânico, o período sazonal e circadiano de coleta, a técnica de extração e as variações genéticas de uma mesma espécie vegetal podem alterar o teor de princípios ativos presentes no extrato (Menezes *et al.*, 2009). Dessa forma, considerando-se essas variáveis, a ausência de resultados positivos dos extratos e partições frente a algumas espécies fúngicas não invalida esta pesquisa de caráter farmacológico e microbiológico, abrindo novas perspectivas de estudos.

Tabela 2. Ação antifúngica das partições hexânica, hidrometanólica e diclorometânica das folhas e cascas de *A. brasiliensis* sobre espécies de *Candida* e de *Cryptococcus*.

Micro-organismos/Amostras	CIM (µg/mL)					
	1	2	3	4	5	6
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	*	*	*	*	*	*
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	*	*	*	*	*	*
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	*	600	*	*	600	300
<i>C. tropicalis</i> ATCC 25922	*	150	*	*	150	150
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 40058	*	300	*	*	300	*
<i>C. dubliniensis</i> ATCC 10568	*	150	*	*	150	*
<i>C. neoformans</i> ATCC 32264	*	*	*	*	*	*
<i>C. gattii</i> ATCC 32078	*	*	*	*	*	*

CIM: Concentração Inibitória Mínima, *: CIM > 1000 µg/mL, 1: partição diclorometânica das folhas, 2: partição hexânica das folhas, 3: partição hidrometanólica das folhas, 4: partição diclorometânica das cascas, 5: partição hexânica das cascas, 6: partição hidrometanólica das cascas.

Após os ensaios de prospecção, observamos que a maior atividade antifúngica foi sobre as espécies de *C. tropicalis* e *C. dubliniensis*. *C. tropicalis* é frequentemente isolada de candidemias e infecções do trato urinário, sendo associada a pacientes admitidos em unidades de terapia intensiva, especialmente aqueles com câncer, que fazem uso de cateter e ou submetidos à antibioticoterapia de amplo espectro (Negri *et al.*, 2012). Esta espécie, apresenta alta propensão de disseminação, o que eleva seus índices de mortalidade. *C. dubliniensis* é uma espécie fúngica oportunista emergente, geralmente associada às infecções orofaríngeas em indivíduos HIV-positivos, mas também tem sido isolada de pacientes com diabetes, fibrose cística e câncer (Loreto *et al.*, 2010).

Este é o primeiro estudo que reporta a atividade antifúngica de *A. brasiliensis* e são raras as pesquisas que buscaram avaliar o potencial biológico desta espécie vegetal. Almeida e cols. (1985) e Silva e cols. (1971) identificaram que extratos hidroalcoólicos de *A. brasiliensis* possuem atividade moluscicida sobre espécimes de *Biomphalaria glabrata* e *B. straminea*, respectivamente. Saito e equipe (2004) avaliaram atividade inibidora de alimentação de extratos alcoólicos de *A. brasiliensis* sobre lagartas dos insetos-pragas *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatalis* e identificaram que o extrato das folhas possui ação antialimentar.

As plantas possuem várias vias metabólicas secundárias que dão origem a diversos compostos, sendo que muitos destes estão associados à atividade antifúngica como é o caso de saponinas, terpenos, alcalóides, cumarinas e taninos (Cown, 1999; Rajeshkumar & Sundararaman, 2012). Análises fitoquímicas das folhas *A. brasiliensis* indicam a presença de saponinas, esteróides triterpenos, cumarinas, taninos e flavonóides (Saito *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2010), entretanto, não há registros na literatura sobre os constituintes químicos das cascas desta planta. Estudos fitoquímicos futuros que busquem analisar as cascas *A. brasiliensis* devem ser realizados para melhor compreender seu potencial biológico. Desta forma, o presente trabalho abre perspectivas para o isolamento e identificação dos possíveis compostos responsáveis pela atividade antifúngica da planta estudada.

CONCLUSÃO

Em nosso estudo identificamos que os extratos hidrometanólico, dicloroetanólico, partição diclorometânica e hexânica das folhas e extrato dicloroetanólico e partição diclorometânica das cascas de *A. brasiliensis* não evidenciaram atividade antifúngica. Os ensaios de prospecção indicaram que o extrato hidrometanólico das cascas inibiu o crescimento de *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* e *C. neoformans* na concentração de 300 µg/mL e de *C. gattii* na concentração de 600 µg/mL. Dentre as partições estudadas, as hexânicas das folhas e das cascas apresentaram maior potencial antifúngico, sendo ativas contra *C. krusei* (CIM=600 µg/mL), *C. tropicalis* (CIM=150 µg/mL), *C. parapsilosis* (CIM=300 µg/mL) e *C. dubliniensis* (CIM=150 µg/mL). Os resultados sugerem que esta espécie vegetal pode representar um potencial alvo para a descoberta de novos compostos para o tratamento de infecções fúngicas. Estudos futuros devem ser realizados a fim de melhor caracterizar as propriedades farmacológicas de *A. brasiliensis*.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT).

REFERÊNCIAS

- Almeida SP, Proença CEB, Sano SM, Ribeiro JF. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464p.
- Almeida YM, Mendonça MCR, Fonteles MC, Matos FJA. Avaliação da atividade moluscicida de 32 plantas do Nordeste brasileiro. *Rev Med Univ Fed Cear*. 25(1/2): 71-79, 1985.
- Batista JS, Olinda RG, Medeiros VB, Rodrigues CMF, Oliveira AF, Paiva ES, Freitas CIA, Medeiros AC. Atividade antibacteriana e cicatrizante do óleo de buriti *Mauritia flexuosa* L. *Ciênc Rural*. 42(1): 136-141, 2012.
- Chaturvedi V & Chaturvedi S. *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal Pathogen. *Trends Microbiol*. 19(11): 564-571, 2011.
- Conceição GM, Ruggieri AC, Araujo MFV, Conceição TTMM, Conceição MAMM. Plantas do cerrado: comercialização, uso e indicação terapêutica fornecida pelos raizeiros e vendedores, Teresina, Piauí. *Scien Plena*. 7(12): 1-6, 2011.
- Cowan MM. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev*. 12(4): 564–582, 1999.
- Hiruma-Lima CA, Santos LC, Kushima H, Pellizzon CH, Silveira GG, Vasconcelos PC, Vilegas W, Brito AR. *Qualea grandiflora*, a Brazilian “Cerrado” medicinal plant presents an important antiulcer activity. *J Ethnopharm*. 104(1-2): 207–214, 2006.
- Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 97: 1027-1031, 2002.
- Li SS & Mody CH. *Cryptococcus*. *Proc Am Thorac Soc*. 7: 186–196, 2010.
- López-Martínez R. Candidosis, a new challenge. *Clin Dermatol*. 28: 178–184, 2010.
- Loreto ES, Scheid LA, Nogueira CW, Zeni G, Santurio JM, Alves SH. *Candida dubliniensis*: epidemiology and phenotypic methods for identification. *Mycopathol*. 169: 431–443, 2010.
- Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Jr VF, Grynberg NF, Echevarria A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quím Nova*. 25(3): 429-438, 2001.
- Menezes TA, Alves ACBA, Vieira JMS, Menezes SAF, Alves BP, Mendonça LCV. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. *Rev Odontol UNESP*. 38(3): 184-91, 2009.
- Mesquita ML, Paula JE, Pessoa C, de Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Grougnet R, Michel S, Tillequin F, Espindola LS. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. *J Ethnopharm*. 123(3): 439–445, 2009.
- Mishra KP, Ganju L, Sairam M, Banerjee PK, Sawhney RC. A review of high throughput technology for the screening of natural products. *Biomed Pharmacother*. 62(2): 94-8, 2008.
- Nascimento JM & Conceição GM. Plantas medicinais e indicações terapêuticas da comunidade quilombola olho d’água do Raposo, Caxias, Maranhão, Brasil. *Biofar, Rev Biol Farm*. 6(2): 138-151, 2011.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição. NCCLS document M27-A2. NCCLS, Pennsylvania, Estados Unidos, 2002. 51p.

- Negri M, Silva S, Henriques M, Oliveira R. Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 31: 1399–1412, 2012.
- Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Rev Bras Farmacogn*. 18(2): 301-307, 2008.
- Pinho L, Souza PNS, Sobrinho EM, Almeida AC, Martins ER. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim- pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. *Ciênc Rural* [on line]. 42(2), 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-4782012000200022&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 10 de agosto 2012.
- Rajeshkumar R & Sundararaman M. Emergence of *Candida* spp. and exploration of natural bioactive molecules for anticandidal therapy – status quo. *Mycoses*. 55: e60–e73, 2012.
- Regasini LO, Pivatto M, Scorzoni L, Benaducci T, Fusco-Almeida AM, Giannini MJSM, Barreiro EJ, Siva DHS, Bolzani VS. Antimicrobial activity of *Pterogyne nitens* Tul., Fabaceae, against opportunistic fungi. *Rev Bras Farmacogn*. 20(5): 706-711, 2010.
- Roesler R, Malta LG, Carrasco LC, Holanda RB, Sousa CAS, Pastore GM. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciênc Tecnol Aliment*. 27(1): 53-60, 2007.
- Saito ML, Pott A, Ferraz JMG, Nascimento RS. Avaliação de plantas com atividade deterrente alimentar em *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) E *Anticarsia gemmatalis* Hubner. *Pesticidas: R Ecotoxicol Meio Ambiente*. 14: 1-10, 2004.
- Sidrim JJC & Rocha MFG. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 388p.
- Silva Junior IF, Raimondi M, Zacchino S, Cechinel Filho V, Noldin VF, Rao VS, Lima JCS, Martins DTO. Evaluation of the antifungal activity and mode of action of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, stem-bark extracts, fractions and ellagic acid. *Rev Bras Farmacogn*. 20(3): 422-428, 2010.
- Silva Júnior MC. 100 árvores do cerrado: guia de campo. Brasília: Ed. Rede de sementes do Cerrado, 2005. 278p.
- Silva MJM, Souza MP, Rouquayrol MZ. Atividade moluscicida de plantas do nordeste brasileiro (II). *Rev Bras Farmacogn*. 52: 117-123, 1971.
- Silva NLA, Miranda FAA, Conceição GM. Triagem fitoquímica de plantas de cerrado, da área de proteção ambiental municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. *Scien Plena*. 6(2): 1-17, 2010.
- Silva SMFQ, Pinheiro SMB, Queiroz MVF, Pranchevicius MC, Castro JGD, Perim MC, Carreiro SC. Atividade *in vitro* de extratos brutos de duas espécies vegetais do cerrado sobre leveduras do gênero *Candida*. *Ciênc Saúde Coletiva*. 17(6): 1649-1656, 2012.