



Desenvolvimento de sistema nanoestruturado mucoadesivo contendo extratos obtidos a partir de espécies do gênero *Spondias* para o tratamento de candidíase oral

Paloma Nascimento Lima; Angelica Pereira Ribeiro; Natália Lira Messias; Francinalva Dantas de Medeiros

Universidade Estadual da Paraíba – UEPB

paloma.n.lima@hotmail.com; angelyca.p07@hotmail.com; natxi_lira_messias; francinalvamedeiros@gmail.com

A Candidíase oral é uma infecção causada por microrganismos do gênero *Candida*, sendo a principal espécie responsável pela infecção a *Candida albicans*. Na microbiota normal da boca a *C. albicans* é o comensal evidenciado com maior frequência atingindo até 70% do total de isolamentos. Para o tratamento de afecções causadas por esse microrganismo é utilizado o fármaco nistatina, e sua eficácia está relacionada com seu tempo de contato com a mucosa oral, onde se encontra o agente causador da infecção. As infecções fúngicas são de difícil tratamento, devido à resistência dos microrganismos frente aos antifúngicos, portanto, a pesquisa de plantas medicinais com atividade antimicrobiana constitui uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos. A *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown pertence à família Verbenaceae, conhecida popularmente como erva-cidreira é uma planta utilizada na medicina popular com indicações para a candidíase. Além disso, o desenvolvimento de formulações que favoreçam a ação do fitocomposto favorece a sua ação terapêutica, como no caso do uso de quitosana, que tem se mostrado adequada para controlar a liberação de fármacos e por produzir sistemas muco/bioadesivos. Sendo assim, este projeto tem por objetivo o desenvolvimento e caracterização de um gel mucoadesivo constituído de extrato vegetal hidroalcoólico de *Lippia alba*, encapsulado em micropartículas de quitosana. Para esse estudo, os extratos foram obtidos utilizando banho de ultrassom e em seguida foram rotoevaporados. Foi realizado *screening* fitoquímico, para identificação da presença dos principais grupos de metabólitos secundários. Os extratos foram submetidos a testes de atividade frente à cepa de *Candida albicans*, através do método de microdiluição. Como resultado verificou os teores de 1,78% e 8,48% referentes a flavonóides e polifenóis, respectivamente. Foi identificado o perfil cromatográfico do extrato, a ser utilizado como impressão digital do extrato em estudo. A preparação de micropartículas de quitosana contendo o extrato em estudo mostrou uma melhora de sua estabilidade térmica, melhorando as características tecnológicas do extrato para que este possa vir ser utilizado na produção de uma formulação farmacêutica mucoadesiva, o que favorece a eficácia terapêutica do extrato. Os resultados da avaliação microbiológica apresentaram uma atividade antimicrobiana satisfatória, sendo possível a indicação desse extrato como promissor para o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico para o tratamento de candidíase oral.

Palavras-chave: *Candida albicans*, *Lippia Alba*, Medicamento fitoterápico.

1. Introdução

Atualmente, as plantas medicinais são utilizadas por grande parte da população mundial, como um recurso de medicina alternativa para o tratamento de diversas enfermidades, uma vez que em muitas comunidades, representam um recurso mais acessível em relação aos medicamentos alopáticos (Bevilacqua, 2010).

As infecções fúngicas são de difícil tratamento, fato intrinsecamente relacionado à aquisição por parte de seus agentes etiológicos de resistência frente à ação de antifúngicos (Araújo et al., 2004). As plantas podem ser constituídas de fontes úteis de substâncias



fungitóxicas, as quais, comparadas com fungicidas sintéticos, mostram-se praticamente inofensivas para o meio ambiente, podendo até superá-las em sua ação antimicrobiana (Fawcett e Spencer, 1970).

A Candidíase oral é uma infecção causada por microrganismos do gênero *Candida*, sendo a principal espécie que causa a infecção, a *Candida albicans*, geralmente encontrada na boca de indivíduos saudáveis. A espécie é causadora de infecções mucocutâneas que não comprometem o indivíduo, mas também pode causar doenças invasivas, podendo envolver quase todos os órgãos, considerado um patógeno oportunista (Samaranayake, 1990). Na microbiota normal da boca a *Candida albicans* é o comensal evidenciado com maior frequência atingindo até 70% do total de isolamentos (Jorge et al., 1997; Nery et al., 1994). No entanto, outros agentes também causam a candidíase, como por exemplo: *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. dubliniensis* (Mayer et al., 2013).

Para o tratamento de afecções causadas por espécies do gênero *Candidas* o fármaco nistatina é a substância mais comumente utilizada (Brescansin, 2013). De acordo com suas características farmacológicas, a nistatina é empregada para uso tópico, mesmo quando usada por via oral, desejando um efeito superficial na mucosa oral e digestiva (Epstein & Polsky, 1998).

Nesse contexto, a procura por produtos naturais com atividade antimicrobiana tem merecido destaque, principalmente com o advento de cepas multirresistentes, além dos inconvenientes apresentados pelos fármacos de origem sintética. Nos últimos anos houve um aumento do mercado mundial de fitoterápicos, seja pela busca por alternativas terapêuticas ou devido à falta de avanço das terapias convencionais em tratar doenças crônicas ou de fisiopatologia multifatorial.

A região semiárida brasileira é obtida como grande fonte de biodiversidade vegetal, possuindo um arsenal de compostos que se mostram promissores para estudos farmacológicos. O bioma Caatinga é predominante dessa região, apresenta diferentes tipos de plantas bastante exploradas para o uso medicinal, devidos aos recursos terapêuticos. Diante disso, destaca-se a espécie vegetal *Lippia alba*, com indicação pela medicina popular com atividade antifúngica.

Dentre as formas de uso das plantas como fonte terapêutica incluem-se os chás, os extratos brutos ou suas frações padronizadas em preparações farmacêuticas e os compostos isolados, usados diretamente como drogas ou precursores em processos de síntese. (Rates, 2001). O óleo essencial e o extrato etanólico da *L. alba* apresentam atividade antimicrobiana frente a linhagens de *Candidas*, incentivando novas pesquisas na área farmacológica com



substâncias isoladas com o intuito de estabelecer o constituinte ou os constituintes químicos responsáveis por tal atividade. A nanotecnologia é uma técnica inovadora com eficiência para novas formulações, tornando possível melhorar a terapia de inúmeras doenças.

Além disso, é importante aumentar a eficiência das formulações propostas, e a nanotecnologia vem auxiliar nessas inovações. Dessa forma, sistemas de liberação inovadores vêm sendo desenvolvidos, com destaque para os carreadores nanoestruturados, como a quitosana. A quitosana é um aminopolissacarídeo biodegradável, hidrofílico, de baixa toxicidade e biocompatível, obtido a partir da desacetilação alcalina da quitina, um polímero encontrado em carapaças de crustáceos, cutículas de insetos e parede celular de alguns fungos. Utilizado como sistema de micro ou nanopartículas a quitosana tem se mostrado adequada para controlar a liberação de fármacos, produzir sistemas mucobioadesivos, melhorar a absorção e alternar as características de biodistribuição de fármacos veiculados nesses sistemas (Sarmiento et al., 2007).

Sendo assim, este projeto tem por objetivo Desenvolver um gel mucoadesivo, constituído por extrato nebulizado de plantas do gênero *Lippia* encapsulado em micropartículas de quitosana, visando o tratamento de candidíase oral.

2. Metodologia

2.1. Amostras

Foram coletadas folhas de *Lippia Alba* (Mill.) N. E. Brown (Erva Cidreira) nos municípios de Ingá e Lagoa Seca, localizados na região semiárida paraibana. As coletas foram realizadas no período da manhã. A amostra foi identificada pelo prof. José Iranildo Miranda de Melo, com exsicata depositada no herbário Emanuel Arruda Câmara (ACAM) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), com registro nº 833.

As folhas de *L. alba* foram secas em estufa de circulação de ar a 40°C e, em seguida, pulverizadas em moinho de facas, na Universidade Estadual da Paraíba, campus de Lagoa Seca.

2.2. Obtenção do extrato hidroalcolólico

Foi realizado o processo de extração por esgotamento, utilizando banho de ultrassom e álcool etílico a 96%(v/v) como solvente extrativo. As folhas foram pesadas e transferidas para frascos, onde foi acrescentado o solvente numa proporção de 50g para 250 mL de solvente. A mistura foi submetida ao banho de ultrassom por 60 minutos, em temperatura ambiente, e em seguida realizada filtração. Finalizado o processo de extração, o extrato foi submetido à

retirada do solvente em evaporador rotativo a 40°C, obtendo-se, dessa forma, o extrato hidroalcoólico bruto.

2.3. Obtenção do óleo essencial

O óleo essencial de *L.alba* foi obtido a partir das folhas da planta, utilizando-se o método de hidrodestilação em aparelho de Clevenger, por um período de 1 hora e 30 minutos, após a ebulição. Foram utilizados 200g de folha fresca em 1000 mL de água destilada. O óleo foi armazenado em frascos de vidro e acondicionado a temperatura de aproximadamente - 10°C em *freezer*.

2.4. Avaliação da atividade antimicrobiana

Para a avaliação da atividade antimicrobiana foi utilizado o óleo essencial e o extrato etanólico bruto (EEB), obtidos das folhas de *Lippia Alba*, frente às cepas padrão American Type Culture Collection (ATCC) de *Candida albicans* ATCC (18804), *Candida parapsilosis* ATCC (22009), *Candida guilhermondii* ATCC (6260), *Candida tropicalis* ATCC (13803), disponibilizadas pela fundação Oswaldo Cruz, e isolado clínico *Candida albicans* (LM P20).

A atividade antimicrobiana foi verificada pelo método de microdiluição em caldo, determinando-se a concentração inibitória mínima (CIM) do óleo e do extrato frente aos microrganismos citados. O ensaio foi realizado pelo método da microdiluição em caldo, em microplacas de 96 cavidades, de acordo com o preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010). O controle positivo utilizado foi a nistatina e o controle negativo as soluções hidroalcoólicas utilizadas na produção do extrato, bem como o DMSO (Dimetilsulfóxido), solvente utilizado para a solubilização do extrato e para a diluição do óleo. Os inóculos fúngicos foram padronizados conforme descrito na Farmacopéia Brasileira 5ª edição (2010) e adicionados aos poços. As placas foram incubadas a $25 \pm 0,5$ °C, por 48 horas. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração do extrato que inibiu o crescimento microbiano visível, confirmado pelo corante resazurina.

2.5. Atividade citotóxica

Coletou-se 10 mL de sangue do pesquisador e este foi armazenado em tubo heparinizado, em seguida centrifugado a 2500 rpm durante 10 minutos. Posteriormente foi separado o plasma e o conteúdo sedimentado, as hemácias, foram submetido a 3 lavagens com solução salina.

Foi retirado 1mL da suspensão hemácias e adicionado em um tubo de ensaio contendo 19 mL de solução salina. Finalizado esse processo, em tubos diferentes foi adicionado 100 µL



da solução do extrato hidroalcoólico nas concentrações de 1; 2,5 e 5 mg.mL⁻¹, logo em seguida, foi adicionado 100 µL da suspensão de hemácias, os tubos foram incubados a 37°C durante 1 hora.

Antes de realizar a leitura, as amostras foram submetidas novamente a uma centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos. Em seguida foi adicionado o conteúdo em uma microplaca com 96 poços, cada concentração foi colocada em triplicata, como padrão negativo foi utilizado suspensão de hemácias com DMSO a 10% e como padrão positivo utilizou-se solução de ácido acético a 2% com a suspensão de hemácias. A leitura foi realizada utilizando um leitor de placas (ELISA) de modelo EZ READ 2000, num comprimento de onda referente a 510 nm. A amostra branco da análise foi à solução de extrato juntamente com DMSO a 10%, após a obtenção dos resultados realizou-se o cálculo do IC50.

2.6. Triagem Fitoquímica

2.6.1 Teste de identificação de taninos

Em um tubo de ensaio contendo 2mL do extrato hidroalcoólico foi adicionado 5 mL de água destilada e algumas gotas de cloreto férrico a 2%. Para a reação ser considerada positiva, observa-se a formação e a coloração de precipitados. A coloração verde indica a presença de taninos condensados enquanto que a azul, indica a presença de taninos hidrolisáveis.

2.6.2 Determinação do teor de polifenóis totais

Para a determinação de polifenóis totais, utilizou-se a metodologia descrita por Chandra e Mejía (2004), com modificações. Dessa forma, numa microplaca de 96 cavidades adicionou-se 50 µL da solução de extrato e 50 µL do reagente de Folin-Ciocalteu 1N, e foi deixada em repouso por 1 minuto. Em seguida, adicionou-se 100 µL de uma solução aquosa de Na₂CO₃ a 20%. A solução foi incubada por mais 10 minutos e as absorbâncias foram medidas utilizando um leitor de microplacas (ELISA) num comprimento de onda de 757 nm, em triplicata. A amostra branco foi preparado com todos os reagentes, exceto a amostra.

O teor de polifenóis totais foi determinado pela interpretação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrão de ácido gálico que foi preparada pela dissolução de 10 mg do padrão em 100 mL de água destilada. Depois de preparada essa solução foram preparadas as diluições em triplicata, de modo a obter as



seguintes concentrações; 1, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 35 e $40\mu\text{g.mL}^{-1}$, e expresso por miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de extrato.

2.6.3 Determinação do teor de flavonóides

O teor de flavonóides foi determinado utilizando a metodologia de Meda et AL (2005). A amostra foi diluída numa proporção de 1mg.mL^{-1} em metanol. Foi acrescido $100\ \mu\text{L}$ da solução do extrato a $100\ \mu\text{L}$ de uma solução em metanol de AlCl_3 a 2% (p/v) numa microplaca de 96 poços. O composto permaneceu em repouso por 10 minutos, em seguida foi realizada a leitura da absorvância utilizando comprimento de onda de 415 nm. O branco da análise foi dado por $100\ \mu\text{L}$ de metanol juntamente com $100\ \mu\text{L}$ de AlCl_3 a 2% em metanol.

Os testes foram realizados em triplicata, e para o cálculo do doseamento foi utilizada a curva padrão de quercetina que foi preparada numa proporção de 10 mg de quercetina em 100 mL de metanol. Em seguida essa solução foi submetida a diluições em triplicata no qual obteve soluções de quercetina nas concentrações de 2, 4, 6, 8, 10, 13, 16, 19, 22, 26, 28 e $30\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os teores de flavonóides foram expressos em miligramas equivalentes de quercetina.

2.7 Caracterização cromatográfica

Para a análise utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do extrato de *L. alba* utilizou-se um cromatógrafo líquido. Foi utilizada uma coluna empacotada com octadecilsilano (Phenomenex, Gemini C-18, 250 mm x 0,46 mm, $5\mu\text{m}$). A fase móvel que forneceu melhor seletividade ao método foi constituída de um gradiente de metanol: ácido acético 0,1%, iniciando com 10% de metanol até 3 min, indo até 90% de MeOH em 35 min, e retornando a 10% de MeOH até 38 min. As análises foram realizadas em temperatura controlada (30°C), utilizando um fluxo de $1\ \text{mL.min}^{-1}$, volume de injeção de $20\mu\text{L}$. Comprimento de onda de 270 nm. Todas as amostras foram filtradas com filtros de seringa $0,45\mu\text{m}$ de diâmetro.

2.8 Obtenção das Micropartículas

Foi utilizado uma solução de quitosana a 1% (m/v), preparada a partir de uma solução aquosa de ácido acético a 1% (v/v), em uma proporção de 3 partes do extrato para 1 da solução (3:1 v/v). A solução foi seca em um aparelho Spray Dryer produzindo as micropartículas, com temperatura de entrada do ar de $100\ ^\circ\text{C}$ e vazão do ar comprimido de 45L.h^{-1} , vazão de bomba peristáltica foi de $0,40\ \text{mL.min}^{-1}$ e vazão de ar de secagem de $4,5\ \text{L.h}^{-1}$.



2.9 Análise termogravimétrica / análise termogravimétrica derivada

As curvas calorimétricas obtidas por e análise térmica diferencial (DTA) foram realizadas utilizando um DTG-60 (Shimadzu). Amostras foram aquecidas em uma taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, com uma variação de temperatura de 25 °C a 450 °C por 45 minutos, em uma atmosfera de nitrogênio. As amostras foram acondicionadas em um cadinho de alumina, contendo aproximadamente 7 mg de amostra.

3. Resultados e Discussão

3.1 Screening Microbiológico

A Tabela 1 mostra os resultados de análise do óleo essencial de *Lippia alba* frente a microrganismos do gênero *Cândida*.

Tabela 1. Atividade antifúngica do óleo essencial de *L. Alba* frente a cepas de *Candida* spp.

Amostra	CIM (mg.mL ⁻¹)				
	C. a 1	C. a 2	C. p	C. k	C. t
OE2	NA	NA	0.5	0.0078	0.0156
OE3	0.75	0.1875	0.75	0.0117	0.0117

OE2: óleo essencial a 2mg.mL⁻¹; OE3: óleo essencial a 3 mg.mL⁻¹; C. a 1: *Candidaalbicans* clínica; C. a 2: *Candidaalbicans* ATCC; C. p: *Candidaparapsilosis* ATCC; C. k: *Candidakrusei* ATCC; C. t: *Candidatropicalis* ATCC.

A tabela 2 mostra os resultados referentes a análise microbiológica dos extratos etanólicos e hidroalcoólicos de *L. alba*, frente a *Candida albicans* ATCC.

Tabela 2. Atividade antifúngica dos extratos de *Lippia alba* frente *Candida albicans*.

Amostra	CIM (mg. mL ⁻¹)
Extrato etanólico	0.5000
Extrato hidroalcoólico 50%	0.5000

De acordo com os dados obtidos, observa-se que os extratos etanólico e hidroalcoólico, mostraram-se eficazes no combate frente à *Candida albicans*, considerada o principal microrganismo causador da patologia em estudo.



O óleo essencial de *Lippia alba* apresentou excelente eficácia na inibição do crescimento das leveduras submetidas ao ensaio. A atividade contra leveduras do óleo essencial da *L. Alba* (cital e mirceno-cital) já foi estudada e sua ação antifúngica já foi confirmada contra patógenos humanos, como *C. albicans*, *C. guilhermondi*, *C. parapsilosis*, *C. neoformans* e *Trichophyturnrubrum*, segundo Oliveira e colaboradores (2006). Estudo realizado por Duarte e colaboradores (2005) referiram a atividade antifúngica do óleo essencial da *Lippia alba*, na qual obteve resultado eficaz, inibindo o crescimento da *Candida albicans*.

3.2 Determinação da citotoxicidade

A leitura da citotoxicidade foi no equipamento ELISA, que logo em seguida obteve-se a equação da reta: $Y=2,5664x-2,38$, no qual apresentou um coeficiente de correlação referente à $R^2=0,9982$ e um $IC50=2,32mg.mL^{-1}$. Sabendo-se que as concentrações utilizadas do extrato foram 1; 2,5 e 5 $mg.mL^{-1}$, foi observado que a dose segura para utilização do extrato foi de 2,5 $mg.mL^{-1}$.

Em laboratórios, a verificação de hemólise *in vitro*, vem sendo empregado constantemente em pesquisas de toxicidade em plantas medicinais. Este teste é biológico e é utilizado para toxicidade aguda, que normalmente é considerado essencial como estudo preliminar na determinação de compostos com propriedades biológicas. A maioria das plantas em doses elevadas é tóxica por isso se torna necessário à determinação da toxicidade dos extratos (Kalegariet al., 2011).

3.3 Caracterização fitoquímica

A reação do extrato com cloreto férrico, para a determinação de taninos, não promoveu a mudança de coloração, dessa forma, constata-se que não há presença de taninos condensados no extrato de *L. Alba*.

O teor de flavonóides e polifenóis do extrato de *L. Alba* foi de 1,78% e 8,48% respectivamente, verificando que os compostos bioativos podem sofrer variações de acordo com a época de colheita.

3.4 Análise cromatográfica

O extrato foi submetido à análise cromatográfica por CLAE a fim de investigar a presença de alguns polifenóis, devido ao que foi observado na caracterização Fitoquímica. A figura 2 apresenta o cromatograma do extrato de *L. alba*, que pode ser utilizado como impressão digital do extrato, no comprimento de onda de 270 nm.

Figura 2. Cromatograma do extrato de de *L. alba*, no comprimento de onda de 270 nm.



O cromatograma obtido foi comparado com o de quatro diferentes padrões da classe dos polifenóis para avaliar sua presença. A presença de compostos, ácido caféico (figura 3), catequina (figura 4), rutina (figura 5) e quercetina (figura 6), foi investigada através da comparação dos tempos de retenção das respectivas amostras padrão com as soluções das amostras de *L. alba*. Além disso, foi comparado os espectros de UV dos padrões analisados com demais picos apresentados nas amostras, não encontrando nenhuma correlação entre os compostos avaliados e os constituintes encontrados nas amostras da planta.

Figura 3. Cromatograma do padrão de ácido caféico, no comprimento de onda de 270 nm.



Figura 4. Cromatograma do padrão de catequina, no comprimento de onda de 270 nm.



Figura 5. Cromatograma do padrão de rutina, no comprimento de onda de 270 nm.



Figura 6. Cromatograma do padrão de quercetina, no comprimento de onda de 270 nm.



3.5 Análise térmica diferencial

As curvas calorimétrica de DTA do extrato de *L. alba*, da quitosana e das micropartículas obtidas por Spray Dryer, podem ser visualizadas na figura 7. Os picos de cada evento estão descritos na tabela 3.

Figura 7. Curva de DTA do extrato e da quitosana.

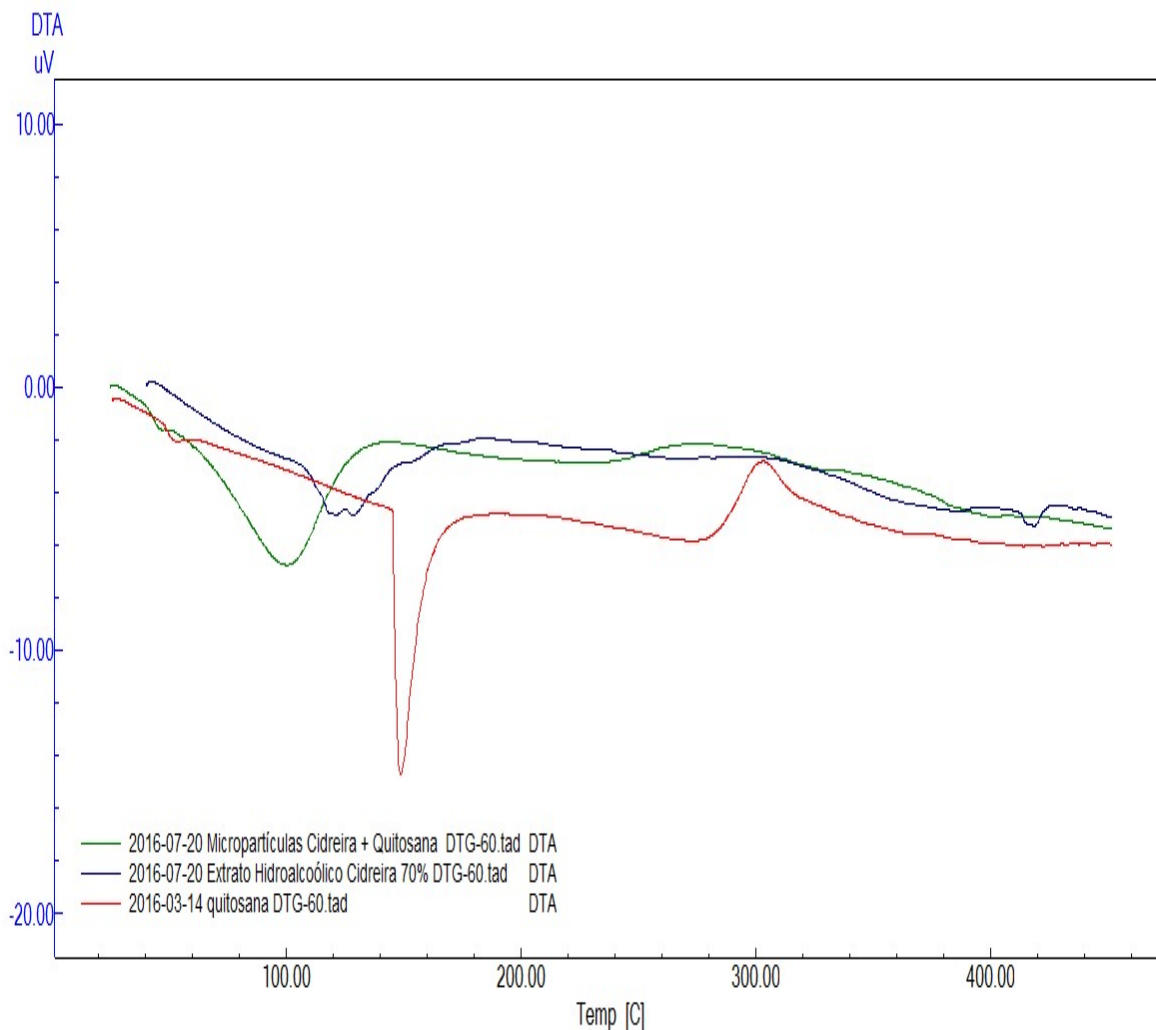




Tabela 3. Dados da curva de DTA.

Temperatura (°C)	Pico	ΔH : (J/g)	Evento
Extrato de <i>L. Alba</i>			
111,59-144,12	121,31	237,92	Endotérmico
412,74-422,44	418,70	16,51	Endotérmico
Quitosana			
145,55-158,91	148,87	248,78	Endotérmico
286,36-321,93	303,41	235,51	Exotérmico
Micropartículas			
64,18-124,52	100,34	867,48	Endotérmico
285,51-322,61	274,38	179,94	Exotérmico

As micropartículas de quitosana contendo o extrato vegetal utilizado apresentaram perfil térmico semelhante ao do extrato analisado isoladamente, o que pode indicar que parte deste encontra-se adsorvido as partículas de quitosana, sendo necessário um prévio preparo da amostra antes da análise, porém foi evidente a observação do aumento da estabilidade térmica do extrato quando incorporado as micropartículas de quitosanas.

4. Conclusões

Os resultados obtidos mostram a capacidade do extrato vegetal de *Lippia alba* em apresentar eficácia na inibição do microrganismo *Candida albicans*, validando cientificamente seu potencial antifúngico. Ademais o extrato das folhas de *L alba* apresentaram uma quantidade significativa de teor de flavanóides e polifenóis totais, sendo possível a padronização do extrato com base na sua caracterização cromatográfica. A preparação de micropartículas de quitosana contendo o extrato em estudo mostrou uma melhora de sua estabilidade térmica, melhorando as características tecnológicas do extrato para que este possa vir ser utilizado para a produção de um medicamento fitoterápico, além de permitir o desenvolvimento de uma formulação mucoadesiva que favorece a eficácia terapêutica do extrato. Dessa forma, este estudo aponta a importância de investigar o potencial antimicrobiano do extrato das folhas de *L. alba* frente a *Candida albicans* a fim de se desenvolver um fitoterápico para o tratamento da patologia em estudo.



5. Referências

ARAÚJO JCLV, Lima EO, Ceballos BSO, Freire KRL, Souza EL, Santos Filho L 2004. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismo potencialmente causadores de infecções oportunistas. *RerPatol Trop* 33: 55-64.

BEVILACQUA, H. G. C. R. Planejamento de horta medicinal e comunitária. Divisão Tec. Esc. Municipal de Jardinagem/ Curso de Plantas medicinais – São Paulo, 2010.

BRESCANSIN, E. G.; PORTILHO, M.; PESSINE, F. B. T. Physical and chemical analysis of commercial nystatin. *ActaScientiarum*, v. 35, n. 2, p. 215-221, 2013.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. (2005). *Anti-Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *J.Ethnopharmacol.*

EPSTEIN, J. B. & POLOSKY, B. Oropharyngeal candidiasis: a review of its clinical spectrum and current therapies. *Clinical Therapeutics*, v. 20, n. 1, p. 40-57, 1998.

FAWCETT, C.H.; SPENCER, D.M. Plant chemotherapy with natural products. *Ver. Phytopath, Palo*, v.18, p.403-418, 1970.

JORGE AOC, Koga Ito Gy, Gonçalves CR 1997. Presença de leveduras do gênero *Candida* na saliva de pacientes com diferentes fatores predisponentes e de indivíduos controle. *RevOdontoUniv São Paulo* 11: 279-285.

KALEGARI, M.; MIGUEL, M. D.; DIAS, J. F. G.; LORDELLO, A. L. L.; MIYAZAKI, C. M. S.; ZANIN, S. M. W.; VERDAM, M. C. S.; MIGUEL, O. G. Phytochemical constituents and preliminary toxicity evaluation of leaves from *Roureainduta* Planch (Connaraceae). *Brazilian J Pharmaceutical Sci.*, v. 47, n. 3, p. 635-642, 2011.

MAYER FL.; Wilson D. and Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*; 4 (2), 119–128, 2013.

NERY EO, Gonçalves CR, Shimizu MT, Unterkircher CS, Fantinato V, Jorge AOC 1994. Influência dos antígenos do sistema ABO (H) na saliva sobre a presença do gênero *Candida* na cavidade bucal. *Ver OdontoUniv São Paulo* 81: 37-41.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. C.; SANTOS, S. S.; BIZZO, D. H. R.; LOPES, D.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S.; LEITÃO, S. G. (2006). Ethnopharmacological study of two *Lippias* species from Oriximina, Brazil. *J.Ethnopharmacol.*

RATES S.M.K. Plants as source of grugs. *Toxicon* 2001; 39:603-13.

SAMARANAYAKE LP. Oral candidosis: na old disease in new guises. *Dent Update* 1990; 17: 36-38

SARMENTO, B.; RIBEIRO, A.; VEIGA, F.; SAMPAIO, P.; NEUFELD, R.; FERREIRA, D. Alginate/chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery. *Pharm Res*, v.254, p.2198-206, 2007.