
Efeito do extrato de *Caryocar brasiliense* (Pequi) sobre o fungo *Candida albicans*

Effect of *Caryocar brasiliense* (Pequi) extract on fungus *Candida albicans*

Priscila Raquel Martins¹;
Juliana de Oliveira Castro²

RESUMO

O *Caryocar brasiliense* (*C. brasiliense*), popularmente conhecido como pequi, é uma planta de porte arbóreo, nativa do cerrado e de grande interesse econômico. O objetivo do presente trabalho foi avaliar se o extrato do *C. brasiliense* apresenta atividade antimicrobiana contra o fungo *Candida albicans* (*C. albicans*), comparando diferentes extratos (aquoso e hidroalcoólico) em diferentes períodos de incubação. Observamos que, independentemente do período de incubação, as médias das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) foram sempre superiores no grupo extrato aquoso quando comparado ao seu controle negativo, a água. Porém, a análise estatística demonstrou diferença

significativa apenas nos grupos de 4 e 8h de incubação. Resultados semelhantes foram observados entre os grupos álcool e extrato hidroalcoólico, exceto às 8h de incubação. Como era de se esperar, houve inibição das UFCs pelo extrato hidroalcoólico quando comparado ao extrato aquoso. Esse resultado é devido a inibição causada pela ação do álcool. Encontrou-se um número maior de UFCs no extrato hidroalcoólico quando comparado ao seu controle negativo, o álcool. Pode-se concluir que extratos obtidos das folhas de *C. brasiliense* estimulam o crescimento de *C. albicans*. São necessárias novas pesquisas comparando diferentes concentrações dos extratos e a caracterização química dos compostos extraídos em cada metodologia utilizada.

1. Docente das Faculdades Integradas de Bauru.

2. Biomédica graduada pelas Faculdades Integradas de Bauru.

PALAVRAS-CHAVE: *Caryocar brasiliense*, Atividade Antifúngica, *Candida albicans*.

ABSTRACT

The *Caryocar brasiliense* (*C. brasiliense*), popularly known as Pequi, is a plant small tree, considered one of the species in the cerrado of greater economic interest. The present study aimed to evaluate whether the extract *C. brasiliense* has antimicrobial activity against the fungus *Candida albicans* (*C. albicans*), comparing different extracts (aqueous and hydroalcoholic) at different incubation periods. We note that, regardless of the incubation period, the mean CFUs were always higher in the group aqueous extract when compared to its negative control (water). However, statistical analysis showed a significant difference only in groups of 4 and 8 hours of incubation. Similar results were observed between the groups alcohol and hydroalcoholic except at 8h of incubation. As might be expected, there was inhibition of CFUs by hydroalcoholic extract compared to aqueous extract. This result was achieved by the inhibition caused by the action of alcohol. But curious fact was that we found a higher number of CFUs in hydroalcoholic compared to its negative control (alcohol). Based on these, our results demonstrated that

extracts from the leaves *C. brasiliense* stimulate the growth of *C. albicans*. Necessary further research comparing different concentrations of the extracts and a chemical characterization of the compounds extracted in each methodology.

KEYWORDS: *Caryocar brasiliense*, Antifungal Activity, *Candida albicans*.

1. INTRODUÇÃO

As plantas de uso medicinal têm um valor altíssimo no mercado nacional e internacional. O Brasil detém o maior potencial e riqueza em termos de diversidade biológica e tem o mercado internacional voltado para obtenção de insumos e matérias-primas inovadoras, buscando substâncias com maior eficácia e que apresente baixa toxicidade e efeitos colaterais. As indústrias farmacêuticas, de cosméticos e alimentícias obtêm, através das nossas florestas, inúmeras possibilidades de geração de novos produtos (1). Desta forma, compostos extraídos da vegetação nativa, que são encontrados em abundância no território brasileiro, podem constituir uma alternativa terapêutica interessante (2).

Embora muitas pesquisas busquem isolar os componentes ativos dessas plantas, o efeito de um fitoterápico normalmente se dá pela ação sinérgica entre os compostos (3). Com uma estrutura química

diferente dos antibióticos derivados de microrganismos, os antibióticos vegetais podem ativar ou bloquear reações e síntese enzimática de patógenos, ou mesmo alterar a estrutura de membranas (4). Além disso, os fitoterápicos têm baixo custo e seu uso é incentivado pelo Ministério da Saúde (5).

O *Caryocar brasiliense* Cambess (*C. brasiliense*) pertence à família Caryocaraceae, e é popularmente conhecido como pequi. Caracteriza-se por uma planta de porte arbóreo que pode atingir até 12 metros de altura, com folhas compostas e trifoliadas, apresentando frutos de coloração verde-claros à levemente amarelado (6,7). Distribuído amplamente nas regiões central e sudeste do Brasil (8), a espécie de maior incidência é o *Caryocar brasiliense* Camb, porém o *C. villosum*, o *C. coriaceum*, o *C. barbinerve*, o *C. crenatum* e o *C. edulis* também são encontradas no país (9). Trata-se de uma espécie bastante promissora, com múltiplas utilidades, considerada uma das espécies nativas do Cerrado de maior interesse econômico. São utilizadas para exploração madeireira e frutífera, com aplicações e potencial de uso na culinária, produção de combustíveis, lubrificantes, fabricação de cosméticos e suas propriedades terapêuticas (6,10,11,12).

Na medicina popular, folhas e frutos são utilizados para tratamento de

afecções respiratórias, oftalmológicas e hepáticas (13). À planta também é atribuída a propriedade de regular o fluxo menstrual (7), agente tônico contra asma, gripe, resfriado e doenças broncopulmonares (11,12), além de ser altamente calórica, possuindo efeito tonificante, estimulante o apetite, atuando como fonte de vitaminas e lipídeos, constituindo um recurso nutritivo importante para as populações que o consomem (14,15).

Sua constituição química apresenta substâncias responsáveis por relevantes funções biológicas de algumas plantas como a presença de carotenóides, heterosídeos flavônicos, saponínicos, antraquinônicos, taninos, lectina, cumarinos, triterpenos, esteróides e o óleo essencial. Tais compostos apresentam atividades antimicrobianas, antioxidante, antineoplásica e cicatrizante (6,16).

Quanto à sua atividade antimicrobiana, Passos *et al.* (2002) (17) descreveu a atividade antifúngica de diversos extratos das folhas e dos dois principais componentes presentes no óleo essencial das sementes e no óleo da amêndoa de *C. brasiliens*, isolados de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* e *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. Essa mesma fração também demonstrou ser responsável pela ação antifúngica frente ao *Paracoccidioides brasiliensis* (PASSOS, 2001) (18).

Os autores sugerem que a atividade antifúngica de *C. brasiliense* para *Cryptococcus neoformans* pode abrir perspectivas no sentido de desenvolver um fitoterápico eficaz e de baixo custo.

Herzog-Soares *et al.* (2002) (19) demonstram que o *C. brasiliense* pode ser usado como forma alternativa no controle de parasitoses e vetores. Eles avaliaram a ação do extrato bruto etanólico da casca desta espécie, administrado pela via intragástrica, sobre a parasitemia do *Trypanosoma cruzi* em camundongos infectados com formas tripomastigotas do parasito e observaram que, o extrato apresentou uma significativa interferência sobre a curva de parasitemia do *T. cruzi*, reduzindo o número de parasitas no sangue.

O extrato das folhas do pequizeiro apresenta atividade mulcida por combater o hospedeiro intermediário causador da esquistossomose (20), efeito leishmanicida por inibir a proliferação da forma promastigota da *Leishmania amazonensis* e atividade antimicrobiana por inibir o crescimento de enterobactérias (16).

Por outro lado, Pinho *et al.* (2012) (21) testaram o potencial antimicrobiano do extrato hidroalcoólico (EAP) obtido da casca do fruto de pequi frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, mas não observaram atividade antimicrobiana.

Os fungos oportunistas (por exemplo, *Candida*, *Aspergillus*, *Mucor*

e *Criptococcus*) são organismos encontrados em todos os lugares e colonizam a pele ou os intestinos sem causar doença. Somente em indivíduos imunocomprometidos os fungos oportunistas surgem como infecções de risco à vida, caracterizadas por necrose tecidual, hemorragia e oclusão vascular, com resposta inflamatória mínima ou nula (22).

Residindo normalmente na pele, na boca, no sistema digestório e na vagina, o gênero *Candida* são microrganismos versáteis. Em pessoas saudáveis, vive geralmente como comensal e não produz doença. Todavia, a espécie *Candida albicans* (*C. albicans*), é a causadora mais freqüente de infecções fúngicas humanas. Infecções por esse fungo leveduriforme variam de lesões superficiais em pessoas saudáveis a infecções disseminadas em pacientes imunocomprometidos como pacientes diabéticos (23), portadores de HIV (24) e pacientes com câncer sob tratamento quimioterápico (25). Em casos de endocrinopatias como o hipotireoidismo, hipoadrenalismo e diabetes, há um aumento na predisposição a candidíase, associado ao aumento da glicemia e deficiência imune (26). A incidência de *Candida* também aumenta durante a gravidez devido a um aumento na concentração de glicogênio pelas células da mucosa vaginal, causando desconforto para a paciente (27).

Desta forma, a busca de produtos de espécies vegetais nativas com propriedades medicinais representa uma fonte potencialmente útil como adjuvantes no tratamento de infecções fúngicas como, por exemplo, *C. albicans*. Simultaneamente, permitiria um maior conhecimento das potencialidades de nossa abundante flora, contribuindo para que novos produtos fitoquímicos sejam padronizados e usados em concentrações que garantam o efeito terapêutico, podendo ainda representar uma nova fonte de recursos econômicos passíveis de exploração sustentável pelas comunidades tradicionais e/ou rurais que habitam estes biomas.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar se extratos (aquoso e hidroalcoólico), preparados com as folhas do *Caryocar brasiliense*, apresentam atividade antimicrobiana contra o fungo *C. albicans*, em diferentes períodos de incubação. Além disso, contribuir com o conhecimento das potencialidades das espécies vegetais brasileiras.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MICRORGANISMOS

Foi utilizada amostra de *C. albicans* de alta virulência (H-428/03) e, os fungos na forma leveduriforme foram mantidos em meio de cultura Sabouroud 4% glucose-ágar com repiques mensais para sua manutenção.

Cada suspensão de fungo foi ajustada de modo a conter 1×10^6 leveduras/mL (28).

2.2. PLANTA

As folhas foram coletadas no mês de setembro de 2013, no município de Bauru – SP, na Av. Engenheiro Luiz Edmundo Carrijo Coube, em uma região de mata entre o Hospital Estadual de Bauru (HEB) e o posto da Polícia Militar (Figura 1).

Para o preparo dos extratos vegetais foram aproveitadas apenas as folhas da planta que se mostraram íntegras, sem quaisquer sinais de decomposição ou de dano. As folhas foram submetidas a uma dessecação em estufa à temperatura de 40°C durante 24 a 48 horas. Após, foram conservadas em um lugar seco, ao abrigo de luz e temperatura ambiente, até o momento de uso, quando foram trituradas e pesadas.



Figura 1: Imagens da árvore e ramos com folhas de *C. brasiliense*.

2.3. PREPARO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO

De acordo com método descrito por Corrêa (2007) (29), foi utilizada a técnica de maceração a frio, na qual foram empregados 100 mL do solvente (etanol

80%) e 20 g do vegetal previamente preparado. Ambos foram colocados em um erlenmeyer, no qual foi mantido à temperatura ambiente por 7 dias, e sofreu agitações manuais (por cerca de 3 minutos) a cada 2 dias. Durante todo o período, o material esteve vedado

com papel filme e papel alumínio, para evitar evaporação do solvente e proteger o material da exposição à luminosidade (30).

Após preparo, o extrato foi filtrado em coador de papel tipo Melitta®, para retirada de fragmentos grosseiros da planta e, logo após, esterilizadas por filtração em membranas de 0,20 µm (Millipore®).

2.4. PREPARO DO EXTRATO AQUOSO

O extrato aquoso foi preparado para seu uso imediato. Utilizou-se para tanto o método de infusão, onde 100 mL de água destilada fervente foram vertidos sobre 5 g do vegetal (31). Tal mistura foi deixada em repouso por 20 minutos, e a seguir o extrato foi filtrado em coador de papel tipo Melitta® e esterilizadas por filtração em membranas de 0,20 µm (Millipore®) (29).

2.5. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

2.5.1. RECUPERAÇÃO DE FUNGOS VIÁVEIS

De acordo com método descrito por Martins *et al.* (2008) (32) e modificado de acordo com nossas condições experimentais, 100ml da suspensão de *C. albicans* foram incubadas com 20ml dos diferentes extratos (aquoso e hidroalcoólico) de *C. brasiliense* por quatro períodos diferentes (1h, 2h, 4h e

8h) em placas de cultura com 96 poços (TPP®).

Como controle positivo foi utilizado 20ml de antimicrobiano de amplo espectro, o Fluconazol (25µg). Os controles negativos, entretanto, foram realizados com água destilada estéril e etanol 80%. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

Para o ensaio de recuperação de fungos viáveis, após os diferentes períodos de incubação, a suspensão fúngica foi diluída 1:10 com solução salina estéril e 50ml de cada suspensão foi semeado em triplicata em placas contendo meio de cultura Sabouroud, com o auxílio de bastões de vidro em forma de L, por toda a superfície do meio. A seguir, as placas de Petri foram incubadas em estufa a 35°C e após 24h foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs) (32).

2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após obtenção dos resultados, foi realizada uma análise de variância (ANOVA), através do programa estatístico InStat, Grafh-Pad, San Diego, USA, para comparar todos os dados entre si, utilizando o pós-teste de Tukey para um nível de significância $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

O estudo foi feito com 5 grupos experimentais: fluconazol, água, extrato aquoso, álcool 80% e extrato hidroalcoólico que foram divididos e submetidos a 4 tempos diferentes de incubação, sendo eles 1 hora, 2 horas, 4 horas e 8 horas. Os resultados estão apresentados no Quadro 1.

Conforme mostrado no Quadro 1, independente do período de incubação avaliado, as médias das UFCs foram sempre superiores no grupo extrato aquoso quando comparado ao seu controle negativo, a água. Porém, a análise estatística demonstrou diferença significativa apenas nos períodos de 2, 4 e 8 horas de incubação com o extrato aquoso, que favoreceu o crescimento

Quadro 1: Média das UFCs de cada grupo experimental em função do tempo de incubação. Resultados expressos como média \pm desvio padrão.

	Controle + (Fluconazol)	Controle - (Água)	Extrato Aquoso	Controle - (Álcool)	Extrato Hidroalcoólico
1h	140,7 \pm 41,9	20,0 \pm 18,0	124,0 \pm 49,7	34,0 \pm 3,6	144,0 \pm 54,7
2h	103,3 \pm 38,5	116,3 \pm 47,5	151,0 \pm 14,0	0 \pm 0	56,7 \pm 37,9
4h	274,0 \pm 75,0	220,7 \pm 80,4	593,3 \pm 15,2	0 \pm 0	3,0 \pm 3,61
8h	180,3 \pm 16,5	346,7 \pm 48,8	581,3 \pm 126,8	38,7 \pm 52,9	0 \pm 0

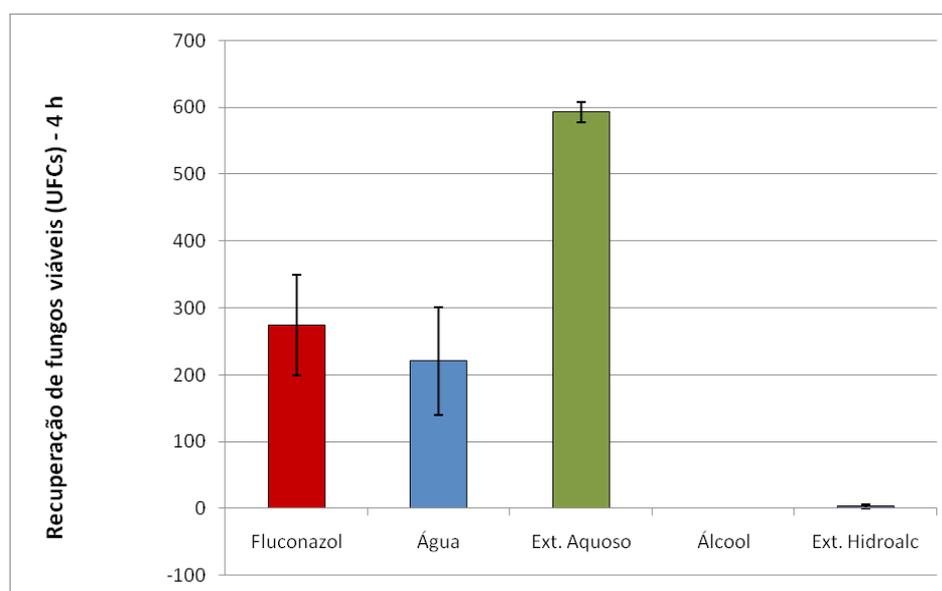


Gráfico 1: Efeito do extrato de pequi sobre a *C. albicans*, após 4h de incubação. Resultados expressos pela média \pm desvio padrão (* $p < 0,01$).

das UFCs de *C. albicans* (Gráficos 1 e 2; e extrato hidroalcoólico, exceto às 8h de Figuras 2 e 3). Resultados semelhantes foram observados entre os grupos álcool

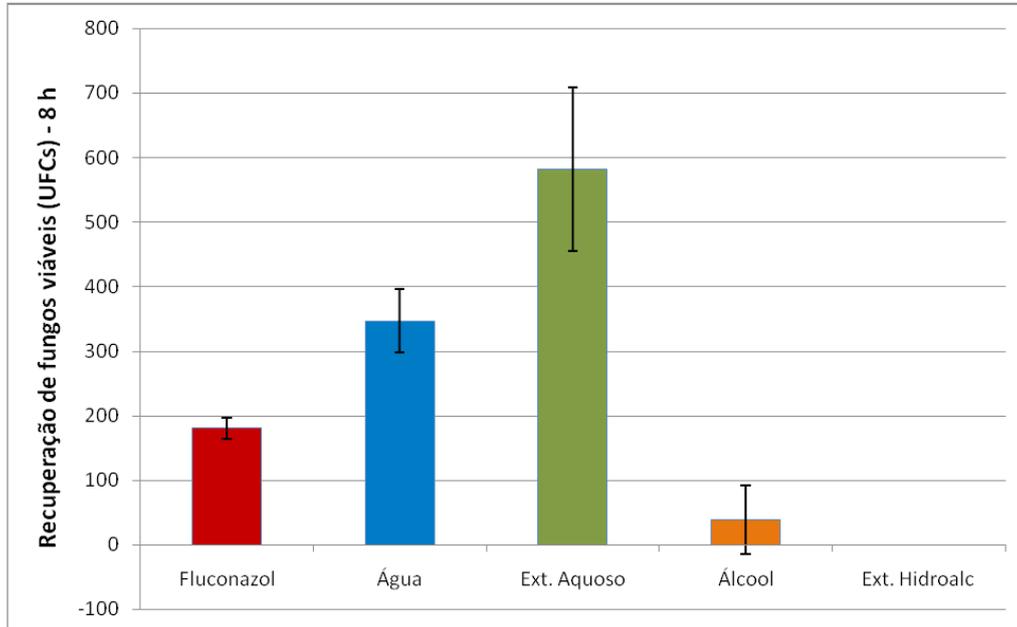


Gráfico 2: Efeito do extrato de pequi sobre a *C. albicans*, após 8h de incubação. Resultados expressos pela média \pm desvio padrão (* $p < 0,01$).

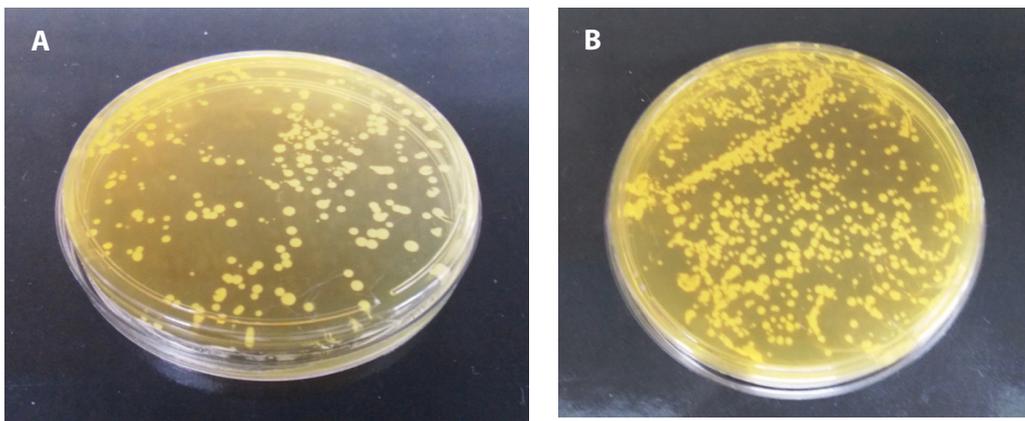


Figura 2: Recuperação das UFCs após 4h de incubação com o controle negativo – Água (A) e Extrato Aquoso (B)

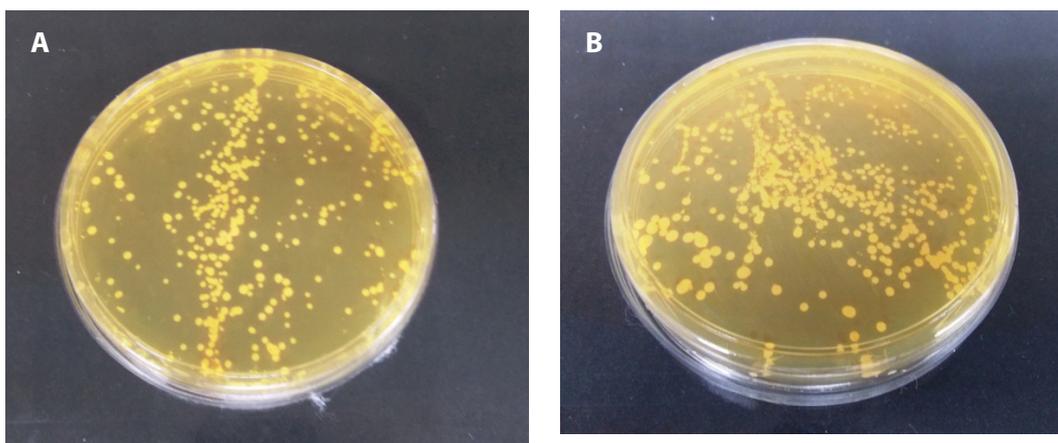


Figura 3: Recuperação das UFCs após 8h de incubação com o controle negativo – Água (A) e Extrato Aquoso (B)

4. DISCUSSÃO

Vários trabalhos na literatura mostram o efeito do extrato de *C. brasiliense* sobre diferentes microrganismos (16,17,18,19, 20,21).

Apesar de estudos citarem resultados positivos referentes ao seu uso (16, 17,18,19,20), no presente trabalho o *C. brasiliense* estimulou o crescimento da *C. albicans* quando comparado aos seus respectivos controles negativos (Quadro 1, Gráficos 1 e 2).

Resultado semelhante foi encontrado no trabalho de Marques *et al.* (2002) (33), em que é relatado o efeito estimulante do *C. brasiliense* sobre fungos parasitas de plantas. Paula-Junior (2006) (16) investigou a atividade antimicrobiana de extratos hidroetanólico das folhas e do mesocarpo interno de *C. brasiliense*

no desenvolvimento de *Candida albicans* e teve como resultado um aumento do número de conídeos após os períodos de incubação. Neste mesmo trabalho o autor também investigou a influência desse extrato no desenvolvimento do fungo *Cryptococcus neoformans* e *Paracoccidioides brasiliensis*; desenvolvimento *in vitro* de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e também contra as bactérias *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Em todos os demais experimentos, exceto com a *C. albicans*, os resultados foram satisfatórios, ocorrendo a inibição dos microrganismos (16).

Uma hipótese que contribui para os resultados encontrados neste trabalho é a possível dificuldade que alguns autores encontram em trabalhar com a *Candida*.

Apesar de não ser um fungo patogênico e viver como comensal no organismo humano, alguns trabalhos experimentais com extratos vegetais mostram como resultados pouca ou até mesmo nenhuma inibição ao crescimento desse microrganismo. Batista (2011) (34) avaliou extratos e substâncias dos frutos de *Buchenavia tomentosa* Eichler (Tarumarana) e *Ouratea spectabilis* Aubl. (Folha-de-serra) testando uma possível atividade antibacteriana, antifúngica e anti-radicalar. Os testes foram realizados com cinco cepas fúngicas, sendo quatro espécies de *Candida*, entre elas a espécie *C. albicans*, e uma de *Cryptococcus*. Em seu trabalho os autores relatam a dificuldade de se encontrar substância com atividade contra este agente infeccioso (34).

Como era de se esperar, houve inibição das UFCs pelo extrato hidroalcoólico quando comparado ao extrato aquoso (Quadro 1). Esse resultado foi possível através da inibição causada pela ação do álcool. Porém, fato curioso é que foi encontrado um número maior de UFCs no extrato hidroalcoólico quando comparado ao seu controle negativo, o álcool (Quadro1).

Fatores ambientais variáveis podem influenciar no potencial de extratos vegetais, tais como: fertilidade do solo, umidade, radiação solar, vento, temperatura, herbivoria, poluições atmosférica e do solo, a idade da árvore

e das folhas utilizadas, bem como a época de coleta. Além disso, a parte da planta utilizada no preparo do extrato, as concentrações testadas e a cepa fúngica também podem influenciar os resultados (3).

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho rejeitam a hipótese de que os extratos aquoso e hidroalcoólico obtidos das folhas de *C. brasiliense* apresentam atividade antimicrobiana contra o crescimento de *C. albicans*. Tais resultados demonstraram ainda que o crescimento de *C. albicans* é estimulado pela presença dos extratos, e que quanto maior o período de incubação, maior o número de UFCs encontradas.

Os fatores que levaram a estes resultados ainda não estão claros, por isso são necessárias novas pesquisas comparando diferentes concentrações dos extratos e também fazendo uma caracterização química dos compostos extraídos em cada metodologia utilizada.

6. REFERÊNCIAS

- 1- Neves MCM. Plantas Mediciniais: diagnóstico e gestão. 2.ed. Brasília: IBAMA; 2001.
- 2- Alves TMA, Silva AF, Brandão M, Grandi TSM, Smânia EFA Smânia-

- Júnior A, Zani CL. Biological screening of Brazilian medicinal plants. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2000; 95(3): 367-373.
- 3- Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Jr VF, Grynberg NF, Echevarria A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. Química Nova. 2002; 25(3): 429-438.
- 4- Michelin DC, Moreschi PE, Lima AC, Nascimento GGF, Paganelli MO, Chaud MV. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. Rev. Bras. Farmacogn. 2005; 15(4): 316-320.
- 5- Santos RL, Guimarães GP, Nobre MSC, Portela AS. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. Rev. Bras. Pl. Med. 2011; 13(4): 486-491.
- 6- Oliveira MEB, Guerra NB, Levi MB, Alves RE. Aspectos Agronômicos e de Qualidade do Pequi. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, Documentos 113; 2008.
- 7- Almeida SP, Proença CEB, Sano SM, Ribeiro JF. Cerrado: espécies vegetais úteis. 1.ed. Planaltina: Embrapa-CPAC; 1998.
- 8- Araujo FD. A review of *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) - An economically valuable species of the Central Brazilian Cerrados. Economy Botany. 1995; 49: 40-48.
- 9- Borges JCA. Características botânicas, aspectos nutricionais e efeitos terapêuticos do pequi (*Caryocar brasiliense*) - Revisão da Literatura [seminários-Portal UFG]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia; 2011.
- 10- Roesler R, Catharino RR, Malta LG, Eberlin MN, Pastore G. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. FoodChemistry. 2008; 110: 711-717.
- 11- Roesler R, Malta LG, Carrasco LC, Holanda RB, Sousa CAS, Pastore GM. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2007; 27(1): 53-60.
- 12- Almeida SP, Silva JA. Piqui e buriti: importância alimentar à população dos cerrados. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, Documentos 54; 1994.
- 13- Rodrigues VEG, Carvalho DA. Plantas medicinais no domínio dos cerrados. 1.ed. Lavras: UFLA; 2001.
- 14- Guimarães M. Guia de alimentação infantil. 1.ed.São Paulo: Ground; 2003.
- 15- Rigueira JA. Pequi: cultivo, caracterização físico-química e processamento. [monografia]. Brasília: Universidade de Brasília, Especialização em Qualidade em Alimentos; 2003.
- 16- Paula-Junior W, Rocha FH, Donatti L, Fadel-Picheth C MT, Weffort-Santos AM. Atividades leishmanicida, bactericida e antioxidante do extrato hidroetanólico das folhas de *Caryocar brasiliense* Cambess. Revista Brasileira de farmacognosia. 2006; 16: 625-630.

- 17- Passos XS, Santos SC, Ferri PH, Fernandes OFL, Paula TF, Garcia ACF, Silva MRR. Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2002; 35: 623-627.
- 18- Passos XS, Costa M, Souza LKH, Miranda ATB, Lemos AA, Ferri PH, Santos SC, Silva MR. Antifungal activity of *Caryocar brasiliensis* against *Paracoccidioides brasiliensis* and *Histoplasma capsulatum*. Anais do XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia. Foz do Iguaçu: 2001. p. 60-71.
- 19- Herzog-Soares JD, Alves RK, Isac E, Bezerra JCB, Gomes MH, Santos SC, Ferri PH. Atividade tripanocida in vivo de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). Revista Brasileira de Farmacognosia. 2002; 12: 01-02.
- 20- Romancini RM, Aquino FG. Aspectos da biologia reprodutiva do pequi-anão (*Caryocar brasiliense* ssp. *Intermedium* Camb., *Caryocaraceae*) em plantio experimental. In: Resumos do Encontro de jovens talentos da EMBRAPA CERRADOS. Planaltina: 2007. p.49.
- 21- Pinho L, Souza PNS, Sobrinho EM, Almeida AC, Martins ER. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. Ciência rural. 2012; 42(2): 326-331.
- 22- Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins & Cotran: Patologia-Bases Patológicas das Doenças. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
- 23- Donders GG. Lower genital tractinfections in diabeticwomen. Curr. Infect. Dis. Rep. 2002; 4: 536-539.
- 24- Klein RS, Harris CA, Smal CB, Moll B, Lesser M, Friedland GH. Oral candidiasis in high-risk patients as the initial manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome. N. Engl. J. Med. 1984; 311: 354-358.
- 25- Ridola V, Chachaty E, Raimondo G, Corradini N, Brugieres L, Valteau-Couanet D, Hartmann O. *Candida* infections in children treated with conventional chemotherapy for solid tumors (transplant recipients excluded): The Institut Gustave Roussy Pediatrics Department experience. Pediatric Blood Cancer. 2004; 42(4): 332-337.
- 26- Martins JEC. Etiopatogenia e aspectos clínicos das candidíases superficiais, cutâneas e cutânea-mucosas. In: Lacaz CS. (Ed). Candidíases. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1980: p.79-88.
- 27- Salvatore CA. Candidíase vulvovaginal. In: Lacaz CS. (Ed). Candidíases. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1980: p.113-120.
- 28- Diogo HC, Melhem M, Sarpieri A, Pires MC. Avaliação do método de disco-difusão para determinação da eficácia da terbinafina in vitro em agentes de micoses superficiais e subcutâneas. An Bras de Dermatol. 2010; 85(3):324-30.

- 29- Corrêa YL. Análise da atividade antifúngica in vitro dos extratos hidroalcoólico e aquoso das folhas do “pequiizeiro” (*Caryocar brasiliense Cambess*). [Trabalho de conclusão de curso]. Dourados: Centro Universitário da Grande Dourados; 2007.
- 30- Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrivic PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 4 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFSC/ Editora da UFRGS; 2003.
- 31- Bunhak EJ, Mendes ES, Pereira NC, Costa SC. Avaliação do efeito de polieletrólito aniônico na clarificação de extrato aquoso de *Stevia rebaudiana*. Ciênc. Tecnol. Aliment. 2004; 24(4): 587-590.
- 32- Martins PR, Gameiro MC, Castoldi L, Romagnoli GG, Lopes FC, Pinto AV, Loyola W, Kaneno R. Polysaccharide-rich fraction of *Agaricus brasiliensis* enhances the candidacidal activity of murine macrophages. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008; 103(3): 244-250.
- 33- Marques MCS, Cardoso MG, Souza PE, Gavilanes ML, Souza JÁ, Pereira NE, Negrão IO. Efeito fungitóxico dos extratos de *Caryocar brasiliense Camb.* sobre os fungos *Botrytis cineria*, *Colletotrichum truncatum* e *Fusarium oxysporum*. Ciênc. Agrotec. 2002; Edição especial: 1410-1419.
- 34- Batista AL. Avaliação da atividade antimicrobiana e antiradicalar dos extratos e substâncias dos frutos de *Buchenavia tomentosa* -Eichler (Combretaceae) e *Ouratea spectabilis* Aubl. (Ochnaceae). [Tese]. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2011.