



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIPROLIFERATIVO DA
***Anadenanthera Colubrina* (Vell.) Brenan**

RENNALY DE FREITAS LIMA

CAMPINA GRANDE – PB

2013

RENNALY DE FREITAS LIMA

POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIPROLIFERATIVO DA
***Anadenanthera Colubrina* (Vell.) Brenan**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa

CAMPINA GRANDE – PB

2013

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

L732p Lima, Rennaly de Freitas.
Potencial antimicrobiano e antiproliferativo da
Anadenanthera Colubrina (Vell.) Brenan [manuscrito] /
Rennaly de Freitas Lima. – 2013.
51 f.; il. color.

Digitado
Dissertação (Mestrado em Odontologia) –
Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-
Graduação e Pesquisa, 2013.

“Orientação: Prof. Dr. Edja Maria Melo de Brito Costa,
Departamento de Odontologia”.

1. Atividade antimicrobiana. 2. Plantas medicinais. 3.
Candida albicans. I. Título.

21. ed. CDD 615.321

RENNALY DE FREITAS LIMA

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIPROLIFERATIVO DA
Anadenanthera Colubrina (Vell.) Brenan**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia

Aprovado em 11/06/2013

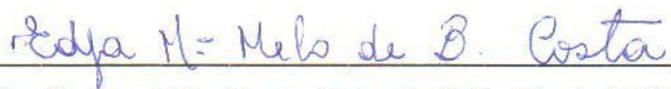
BANCA EXAMINADORA



Prof.ª. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte / UNICAMP
Membro titular (1º Examinador)



Prof.ª. Dra. Daliana Queiroga de Castro Gomes/ UEPB
Membro titular (2ª Examinador)



Prof.ª. Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa/ UEPB
Membro titular (Orientadora)

À minha orientadora, Edja Maria,
Por todo o carinho, amizade e dedicação,
Pela oportunidade de crescimento,
Dedico-lhe este trabalho

Aos meus pais, Zilmarte e Rosinaldo,
Que sonham os meus sonhos e neles se realizam,
Pelo amor incondicional, força e incentivo diário,
Dedico-lhes este trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Inicialmente, a Deus, pois é por ele que tenho forças para enfrentar cada novo dia com garra e fé, sem desanimar diante dos problemas que surgem. À minha mãe celestial, Maria, por proteger meus caminhos com seu manto sagrado e me guiar.

Aos meus maravilhosos pais, por sempre acreditarem em mim, que posso ir além, e por lembrar isso todos os dias. Pela coragem que tiveram ao me forçar a criar asas tão cedo. Por não medirem esforços para me levar à conquistas. Por me ensinar que devo sempre batalhar pelos meus sonhos e por me fazer acreditar que o sucesso chegará.

À minha querida irmã, Gislayny Lima, pelo apoio de sempre e que, mesmo distante, continua se fazendo presente diariamente em minha vida. Por tudo que aprendemos juntas. Pelo amor, ensinamentos e carinho. Por Artur.

Ao meu amado noivo, Daniel Campos, por ter me presenteado com uma nova família. Por me apoiar em todos os momentos da vida e se alegrar com minhas conquistas. Por todo o amor dedicado, por construir comigo o céu aqui na terra. E por semear em mim a vontade de ir sempre além.

À minha querida orientadora, Edja Maria, por ter sido esta maravilhosa surpresa em minha vida. Por todo o carinho, paciência, dedicação e ensinamentos. Por ser exemplo de mulher, mãe, esposa, amiga e, principalmente, de professora. Por acreditar e confiar em mim. Por ter tornado possível a realização deste trabalho. E por ter sido, nos últimos dois anos, força principal para meu crescimento profissional e, principalmente, pessoal. Muito obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

Ao programa de pós-graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, pela notória importância em meu crescimento e pelas oportunidades concedidas.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP), pela oportunidade de conviver, durante três meses, em um dos melhores programas de pós-graduação em Odontologia do país.

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) e sua equipe, pelo imenso auxílio na realização deste trabalho.

Ao professor Pedro Rosalen e toda a sua equipe, pelos ensinamentos, atenção e receptividade durante a minha estadia.

Aos grandes amigos Raulison Vieira, Leonardo Cavalcante e Yasmine de Carvalho, irmãos que a vida me trouxe, pela amizade, apoio e por todos os bons momentos compartilhados.

À minha grande amiga, Carolina Medeiros, pela amizade e apoio diário. Por sempre se preocupar comigo e querer sempre o melhor para mim.

À minha companheira de grupo de pesquisa, Érika Ponchet, por ter se tornado uma grande amiga, força essencial para que eu não desanimasse e persistisse em meus caminhos. Muito obrigada, também, por sua essencial contribuição para a realização deste trabalho.

À querida amiga que a vida me presenteou, Bruna Benso, pelo apoio, amizade e incentivo em todos os dias vividos em Piracicaba. Graças a sua ajuda, meus dias em Piracicaba tornaram-se mais leves e divertidos.

Aos colegas da turma do mestrado, Armiliana Soares, Lorena Nóbrega, Yêska Paola, Maria Betânia, Roniery Oliveira, Manuela Gouveia, Vanessa Abílio, Marcela Lins, Fábio Gomes e Priscila Suassuna, obrigada por terem vivenciado este momento comigo.

Aos queridos colegas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Irlan Almeida, Marcos Cunha, Marcelo Franchin, Bruno Vilela, Ana Paula Bentes, Paula Sampaio, Carina Denny, Jonny Burga, Luiz Eduardo, Talita Graziano, Luciano Serpe, Eliane Melo, pela companhia e boas risadas compartilhadas.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, agradeço por todos os conhecimentos compartilhados e por terem participado desta importante etapa da minha vida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Universidade Estadual da Paraíba, através do PROCAD, pelos auxílios financeiros concedidos, tornando possível a realização deste trabalho.

RESUMO

Este estudo objetivou avaliar *in vitro* o potencial antimicrobiano e antiproliferativo do extrato e frações ativas da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (angico), além de caracterizar fitoquimicamente o extrato. A avaliação antimicrobiana foi realizada através da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida/Fungicida Mínima e inibição de aderência ao biofilme, além da análise da morfologia celular por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para a verificação do potencial antiproliferativo, seis linhagens de células tumorais foram utilizadas. O extrato apresentou forte atividade antifúngica contra a *Candida albicans* ATCC 18804 (CIM = 0,031 mg/mL), sendo observada atividade semelhante para a sua fração de acetato de etila. Em relação à atividade antibacteriana, o extrato da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan apresentou atividade apenas para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (CIM = 0,5 mg/mL). O extrato e a fração ativa também demonstraram capacidade de inibir a aderência da *Candida albicans* em biofilme, após 48 horas de formação, demonstrando valores de mediana equivalentes e maiores que o grupo controle, porém sem diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Observou-se ainda, através da MEV, alterações na morfologia celular da levedura. Em relação à atividade antiproliferativa, o extrato apresentou potencial citostático para todas as linhagens testadas, sendo capaz de diminuir o crescimento celular em uma concentração média de 0,25 mg/mL. Através da caracterização fitoquímica, verificou-se alto teor de polifenóis totais (53,18%). Diante destes resultados, sugere-se forte potencial antifúngico para *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, além de apresentar tendência à diminuição do crescimento celular para linhagens tumorais humanas.

Palavras-chave: produtos com ação antimicrobiana; ensaios de seleção de medicamentos antitumorais; plantas medicinais.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the *in vitro* anti-microbial and anti-proliferative potentials of extract and active fractions of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (Angico). The anti-microbial evaluation was conducted through Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal/Fungicidal Concentration, and biofilm adherence inhibition, as well as a cellular morphology analysis via scanning electron microscope (SEM). To verify the anti-proliferative potential, six tumor cell lines were used. The extract presented severe anti-fungicidal activity against *Candida albicans* ATCC 18804 (MIC = 0,031 mg/mL), with similar activity in regard to its ethyl acetate fraction. Both the extract and the active fraction also showed the ability to inhibit *Candida albicans* adherence in biofilm after 48 hours of formation, showing median values equivalent and higher than those of the control group, but without significant statistical difference ($p > 0,05$). Through the SEM was also observed alterations in the cellular morphology of yeast. With regard to anti-proliferative activity, the extract presented cytostatic potential for all tested lines. In face of these results, it's suggested a strong anti-fungicidal inhibition potential for *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, as well as a tendency for decreasing the cellular growth of human tumor lineages.

Keywords: anti-microbial activity; anti-proliferative effect; medicinal plants.

SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	11
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 METODOLOGIA	15
3.1 LOCALIZAÇÃO DO ESTUDO	16
3.2 MATERIAL VEGETAL	16
3.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO	16
3.4 CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO	16
3.4.1 Microrganismos	16
3.4.1.1 <i>Bactérias</i>	16
3.4.1.2 <i>Levedura</i>	17
3.4.2 Meios de cultura	17
3.4.3 Preparo de inóculo	17
3.4.3.1 <i>Bactérias</i>	17
3.4.3.2 <i>Levedura</i>	18
3.4.4 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM) pelo Método da Microdiluição	18
3.4.5 Leitura dos Resultados da CIM	19
3.4.5.1 <i>Bactérias</i>	19
3.4.5.2 <i>Levedura</i>	19
3.4.6 Determinação da Concentração Bactericida (CBM) ou Fungicida Mínima (CFM)	19
3.5 FRACIONAMENTO DO MATERIAL VEGETAL	19
3.6 INIBIÇÃO DE ADERÊNCIA	20
3.6.1 Efeito do extrato e fração de melhor atividade sobre a adesão dos microrganismos orais	20
3.6.2 Quantificação das células microbianas aderidas	20
3.7 ANÁLISES MICROSCÓPICAS	21
3.7.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliação da	

morfologia celular_____	21
3.8 CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO _____	21
3.8.1 Atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais humanas_____	21
3.9 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA _____	23
3.9.1 Determinação do teor de compostos fenólicos_____	23
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA_____	24
4 RESULTADOS_____	25
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS _____	42
REFERÊNCIAS GERAIS	

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A utilização de plantas medicinais vem recebendo amparo legal significativo nos últimos anos (CARVALHO *et al.*, 2008). Isto tem impulsionado o interesse pela busca de compostos de origem natural, que apresentem boa efetividade, poucos efeitos adversos e que possam auxiliar no controle e tratamento de diferentes doenças. Um importante foco de pesquisa refere-se ao controle do biofilme oral, principal responsável pela formação da cárie dentária e outras doenças orais, como a candidose. Tais doenças constituem um problema de saúde pública e um desafio para pesquisadores e clínicos, especialmente quando presentes em pacientes imunocomprometidos (MACIEL; PINTO; VEIGA JR, 2002).

Diversos microrganismos apresentam resistência aos medicamentos disponíveis no mercado, sendo fundamental o desenvolvimento de estudos que contribuam na obtenção de fármacos naturais seguros, estáveis, padronizados e eficientes frente à resistência adquirida por bactérias e fungos (MACIEL; PINTO; VEIGA JR, 2002). Diante disso, um maior número de pessoas pode se beneficiar em função da melhoria no custo e acesso aos medicamentos (AMORIM *et al.*, 2003).

Analisando o desenvolvimento do mercado farmacêutico e a exploração de novos agentes terapêuticos, observa-se que, nos últimos 25 anos, 50% dos novos medicamentos aprovados por órgãos regulamentadores advêm, direta ou indiretamente, de produtos naturais, demonstrando a necessidade de se estudar a vegetação de forma racional, garantindo os direitos de inovação e patente (NEWMAN; CRAGG, 2009).

A utilização de plantas com efeitos preventivos e terapêuticos, evidentemente, tem contribuído com os cuidados em saúde, havendo três principais razões para o interesse no poder curativo de compostos vegetais: 1) estudos farmacológicos demonstram a presença de agentes antimicrobianos em diversas plantas; 2) as pessoas estão mais cientes acerca dos efeitos secundários associados à utilização excessiva de medicamentos alopáticos e 3) a resistência microbiana à antibióticos convencionais tem aumentado no decorrer dos anos (ABDOLLAHZADEH *et al.*, 2011).

O registro do uso de plantas medicinais é milenar, observando-se que várias espécies são utilizadas pela população para diferentes situações clínicas. Dentre as plantas com potencial antimicrobiano *in vitro* encontra-se a *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, árvore nativa, pertencente à subfamília *Mimosoideae* (Leguminosae) e conhecida popularmente como “angico”. É uma espécie arbórea que ocorre em vários biomas, desde o Nordeste do Brasil até a Bolívia, Argentina, Paraguai e Peru (RODRIGUES; OSUNA, 2004; NEPOMUCENO *et al.*, 2007). É amplamente distribuída e explorada e, em resposta às variações climáticas sazonais, apresentam-se caducifólias durante a estação seca regional (MONTEIRO *et al.* 2006a).

Partindo-se do princípio do uso popular, a *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan é uma das plantas que se destaca por ser vital para a população. É uma das mais utilizadas na medicina popular no nordeste do Brasil para tratar problemas respiratórios e inflamatórios, bem como para cura de diarreia, tosse, bronquite, gripe e dor de dente (MONTEIRO *et al.*, 2006b; AGRA *et al.*, 2007; AGRA *et al.*, 2008).

Carvalho *et al.* (2011), analisando o potencial antifúngico de diversas plantas, verificaram que o extrato mais ativo foi aquele obtido a partir da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, verificando a existência de polifenóis como substâncias ativas, capazes de formar complexos com proteínas e polissacarídeos, inativando enzimas essenciais para o crescimento de fungos.

A caracterização fitoquímica das espécies vegetais para determinação dos grupos de metabólitos secundários é considerada uma abordagem fundamental, visto que tais espécies dispõem de uma rica fonte de substâncias que podem ser úteis no desenvolvimento de formas terapêuticas (JEON *et al.*, 2011), com propriedades antimicrobiana, antioxidante e antiproliferativa (NEWMAN; CRAGG, 2007). Gutierrez-Lugo *et al.* (2004) descreveram o isolamento e caracterização de flavonoides e outros compostos da *Anadenanthera colubrina*, bem como os seus efeitos na lipoxigenase humana. Verificaram uma possível relação entre os compostos da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan e os efeitos protetores na aterosclerose, câncer e doenças inflamatórias, justificando a sua utilização na medicina tradicional para tratar problemas inflamatórios.

Os ensaios preliminares com plantas medicinais para avaliar a atividade antimicrobiana contra microrganismos de relevância clínica são fundamentais, uma vez que podem ser identificados compostos capazes de atuar sobre infecções. Após esta constatação, é recomendável pesquisar o seu potencial em causar danos às células normais do hospedeiro, além do seu efeito sobre linhagens tumorais, com vistas ao desenvolvimento de um produto de uso terapêutico (RODEIRO *et al.*, 2006).

Considerando a disponibilidade dos recursos naturais do nosso país como fonte sustentável de novas drogas e o largo interesse pelo uso de medicamentos de origem natural, estudos sobre as propriedades antimicrobianas e antiproliferativas de extratos vegetais são evidentemente importantes para a Odontologia e podem constituir alternativas viáveis e eficazes para prevenção e tratamento de doenças bucais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* o potencial antimicrobiano e antiproliferativo do extrato e fração ativa da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato vegetal e das frações por meio da determinação das concentrações mínimas inibitória (CIM), bactericida (CBM) e fungicida (CFM) contra microrganismos relacionados às doenças orais;
- ✓ Verificar a ação do extrato e sua fração ativa na inibição de aderência em biofilmes compostos com o(s) microorganismo(s) sensível(is) ao extrato;
- ✓ Identificar a ocorrência de mudanças ou danos na morfologia das células do biofilme quando em contato com o extrato e a fração ativa, através da observação por microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- ✓ Realizar triagem da atividade antiproliferativa *in vitro*;
- ✓ Quantificar os compostos fenólicos presentes no extrato, por meio da espectrofotometria.

3 METODOLOGIA

No presente estudo, foram obtidos extrato e frações da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, sendo realizados testes de avaliação antimicrobiana (CIM - Concentração Inibitória Mínima, CBM/CFM - Concentração Bactericida Mínima e Concentração Fungicida Mínima), a fim de se determinar a ação da planta e sua fração ativa.

O extrato vegetal e a fração ativa foram também avaliados sobre o biofilme oral monoespécie em formação, analisando-se as alterações em suas estruturas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Testes antiproliferativos foram, posteriormente, realizados, quantificando-se ainda os compostos fenólicos do extrato.



Figura 1 *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan



Figura 2 Caule da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan

3.1 LOCALIZAÇÃO DO ESTUDO

O estudo foi realizado no Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos (LABDEM) da Universidade Estadual da Paraíba, no Laboratório de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP) e no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade de Campinas.

3.2 MATERIAL VEGETAL

A planta foi coletada na região do semiárido paraibano, na Serra de Bodocongó, município de Queimadas (7° 22' 25" S, 35° 59' 32"W), na mesoregião da Borborema e micro região do Cariri Oriental, no mês de setembro. O espécime testemunho da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan encontra-se depositado na coleção do Herbário Manuel de Arruda Câmara (ACAM) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus I, Campina Grande, Paraíba (nº 667/ACAM).

3.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO

Obteve-se extrato hidroalcoólico a 80% da casca da planta, através de maceração por 48 horas, utilizando-se a proporção de 10 mg da planta para 25 ml do solvente (CARVALHO *et al.*, 2011), o qual, em seguida, foi rotaevaporado e liofilizado.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO

3.4.1 Microrganismos

3.4.1.1 Bactérias

As bactérias foram selecionadas considerando-se a composição microbiana dos biofilmes orais e os principais microrganismos relacionados à cárie, gengivite e outras infecções da cavidade oral. Foram elas: *Streptococcus*

mutans ATCC 25175, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10557, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

3.4.1.2 Levedura

A levedura *Candida albicans* ATCC 18804 foi inserida no estudo devido a sua co-participação na formação dos biofilmes dentais e sua relação com doenças orais, como a candidose.

3.4.2 Meios de cultura

Para manutenção dos microorganismos, foi utilizado o meio de cultura Brain Heart Infusion Agar (BHI Ágar) para bactérias e o Ágar Sabouraud Dextrose para manutenção da levedura *C. albicans*. Para os testes de atividade antimicrobiana, foi utilizado o meio BHI caldo para bactérias e o RPMI – 1640 (Angus Buffers & Biochemicals, Niagara Falls, NY, USA) para *C. albicans*.

3.4.3 Preparo de inóculo

3.4.3.1 Bactérias

O preparo dos inóculos para os testes de suscetibilidade foram realizados através do método de microdiluição seguindo as recomendações do protocolo M07-A8 para bactérias (CLSI, 2009).

Culturas de bactérias em incubadora de CO₂ (Sanyo MCO-19AIC-UV) foram preparadas no período de 18-24 horas e adicionadas em solução salina estéril (5 mL), ajustando-se sua absorbância entre 0,08 a 0,10 a 625 nm, originando uma concentração equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. A partir desta solução, foram realizadas diluições seriadas obtendo-se, ao final, uma concentração de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL, sendo, desta última solução, 1 mL adicionado em 500 µL de meio de cultura específico, estabelecendo-se uma concentração de 1×10^6 UFC/mL. Nos poços da microplaca inoculados, a solução resultou em uma concentração de 5×10^5 UFC/mL.

3.4.3.2 Levedura

O preparo do inóculo para os testes de suscetibilidade foi realizado através do método de microdiluição seguindo as recomendações do protocolo M27-A3 para leveduras (CLSI, 2008).

Culturas de leveduras de 24 horas foram preparadas e adicionadas em solução salina estéril (5 mL), ajustando-se sua absorbância entre 0,08 a 0,10 a 530 nm, originando uma concentração equivalente a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL. A partir disso, foram realizadas diluições seriadas obtendo-se, ao final da mesma, uma concentração de $5,0 \times 10^5$ UFC/mL, sendo, desta última solução, 1 mL adicionado em 9 mL de meio de cultura RPMI- 1640, homogeneizados e novamente adicionados em 9 mL do meio de cultura, estabelecendo-se uma concentração de 5×10^3 UFC/mL. Nos poços da microplaca inoculados, a solução final resultou em uma concentração de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

3.4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo Método da Microdiluição

Em uma microplaca esterilizada de 96 poços (8 linhas A-H/ 12 colunas), foram depositados 100 μ L dos meios de cultura supracitados. Em seguida, acrescentou-se 100 μ L do extrato e frações nas devidas colunas, sendo realizada, posteriormente, a microdiluição, onde 100 μ L do conteúdo do primeiro poço foi homogeneizado e transferido para o seguinte, repetindo-se este procedimento até a linha H, de modo a se obter concentrações entre 15,62 e 2.000 μ g/mL do extrato e sua fração ativa. Os 100 μ L finais foram desprezados. Posteriormente, 100 μ L do inóculo do microrganismo a ser avaliado, de crescimento recente, foram adicionados. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera aeróbia ou microaerofilia, dependendo da exigência do microrganismo (CLSI 2008, 2009).

Foram incluídos nos testes a clorexidina (Sigma-Aldrich®) e a nistatina (Sigma-Aldrich®), como controle para comparação da atividade antimicrobiana do material vegetal testado. Para verificar o controle do crescimento do microrganismo e a esterilidade do meio de cultura, bem como, dos materiais

vegetais testados, os mesmos foram colocados de forma individualizada nas microplacas.

3.4.5 Leitura dos Resultados da CIM

3.4.5.1 *Bactérias*

Após o período de incubação, foram adicionados 50 μ L da solução de resazurina 0,01% (Sigma-Aldrich®). A CIM foi definida como a menor concentração da amostra capaz de impedir o aparecimento de coloração vermelha, conferida ao meio quando as células apresentam atividade respiratória (CLSI, 2009).

3.4.5.2 *Levedura*

Após o período de incubação, foi verificado se houve mudança de coloração do meio RPMI-1640, de rosa (cor original) para amarelo, o que indica mudança de pH ocasionada pelo crescimento microbiano (CLSI, 2008).

3.4.6 Determinação da Concentração Bactericida (CBM) ou Fungicida Mínima (CFM)

Para determinar a atividade bactericida ou fungicida, uma alíquota de 50 μ L de cada poço, com concentrações maiores que a CIM, foram subcultivadas em meio BHI Agar (bactérias) e Agar Sabouraud Dextrose (levedura), e incubadas a 37°C por 24 horas. As CBM/CFM foram definidas como a menor concentração que inibiu crescimento visível no meio utilizado.

3.5 FRACIONAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

A partição líquido-líquido foi realizada de acordo com gradiente de polaridade, utilizando-se os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila. As frações obtidas foram monitoradas através da Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando-se o reagente anisaldeído, seguido de incubação a

100°C por 5 minutos. Os solventes foram eliminados com auxílio de rotaevaporador, realizando-se, posteriormente, a liofilização das frações.

3.6 INIBIÇÃO DE ADERÊNCIA

3.6.1 Efeito do extrato e fração de melhor atividade sobre a *Candida albicans*

Os biofilmes foram produzidos em placas esterilizadas de polietileno de 96 poços, não tratadas (TPP). Para avaliar a aderência de células microbianas no biofilme, inicialmente, 100 µl de uma suspensão microbiana contendo 10⁵ UFC/mL, cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 acrescido de 2% de sacarose, foram transferidos para cada poço da placa contendo concentrações entre 15,62 e 2000 µg/mL do extrato hidroalcoólico e fração ativa de acetato de etila. Em seguida, a placa foi incubada por 48 horas a 37 °C, sob agitação de 75 rpm. Como controle negativo, três poços de cada placa foram manuseados seguindo a mesma metodologia, sem a adição dos tratamentos. Foi também incluído o controle positivo nistatina. Para verificar o controle do crescimento do microrganismo e a esterilidade do meio de cultura, os mesmos foram colocados de forma individualizada nas microplacas. Os ensaios foram realizados em triplicata em três experimentos independentes (LI *et al.*, 2003).

3.6.2 Quantificação das células microbianas aderidas

As células aderidas aos poços foram lavadas com água destilada e secas à temperatura ambiente por 45 min. Em cada poço foram acrescentados 200 µL de solução aquosa de cristal violeta a 1% por 45 min. Após esta etapa, os poços foram lavados novamente com água destilada e descorados com 200 µL de etanol a 95%. Transcorridos 45 minutos, 150 µL da solução descorada de cada poço foi transferida para uma nova placa e a quantidade do cristal violeta mensurada a 525 nm em leitor de microplacas (SpectraMax 340 Tunable Microplate Reader; Molecular Devices Ltda). Os valores de absorbância das substâncias em teste foram subtraídos dos valores do controle negativo, de modo a avaliar a quantidade de células microbianas aderidas (LI *et al.*, 2003; DJORDJEVIC *et al.*, 2002).

3.7 ANÁLISES MICROSCÓPICAS

3.7.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliação da morfologia celular

Foram inoculadas em meio de cultura RPMI-1640, acrescido de 2% sacarose, células para formação dos biofilmes, em lâminas de LabTek, sendo adicionados o extrato e sua fração ativa nas concentrações capazes de inibir o crescimento do microrganismo (CIM/CFM). Em seguida, as lâminas foram incubadas por 48 horas, a 37°C e 75 rpm. Transcorrido o tempo pré-determinado, as suspensões foram lavadas com glutaraldeído a 3% em tampão fosfato (pH 7,4) por duas vezes, mantendo-se ao final 2 mL dessa substância, à temperatura ambiente, durante 12 horas. As células foram então desidratadas com banhos sequenciais de etanol, nas concentrações de 50%, 70%, 90% e etanol absoluto (duas vezes). Após secagem por 30 minutos à temperatura ambiente, foi realizando metalização com ouro. A integridade da parede celular do microrganismo foi, então, observada ao Microscópio Eletrônico de Varredura (Jeol[®], mod JCM5600LV, Japão). Esta técnica visa verificar a ocorrência de mudanças ou danos na estrutura das células.

3.8 CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO

3.8.1 Atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais humanas

As linhagens celulares utilizadas na triagem da atividade antiproliferativa (Tabela 1), foram cultivadas em frascos com 5 mL de meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, durante 24 horas.

Tabela 1. Linhagens celulares utilizadas nos testes antiproliferativos.

Tipo Celular	Linhagem	Origem	Morfologia
Ovário	NCI-ADR/RES	Ectoderme	Epitelial
Rim	786-O	Mesoderme	Epitelial

Pulmão	NCI-H460	Endoderme	Epitelial
Ovário	OVCAR-3	Mesoderme	Epitelial
Colón	HT-29	Endoderme	Epitelial
Medula óssea	K562	Mesênquima	Linfoblástica
Pele	Hacat	Ectoderme	Fibroblástica

As amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido de sódio (DMSO) na concentração de 0,1 g/mL. Em placas de 96 poços, foram inseridos 100 µL de células no meio RPMI acrescido de SFB e de 1 mL/L de penicilina:estreptomicina (1000 U/mL : 1000 mg/mL, 1mL/L RPMI), sendo as placas posteriormente incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Antes (placa controle T₀) e após a adição das substâncias (placa T₁), as células foram fixadas através da adição de 50 µL por poço de ácido tricloroacético a 50%, para determinação da quantidade de proteínas no momento da adição das drogas. Nas demais placas, as amostras foram adicionadas nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL, (100 µL por poço) em triplicata, sendo incubadas por 48 horas. Como controle positivo, utilizou-se o quimioterápico doxorrubicina, nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25 µg/mL (100 µL por poço) em triplicata. Após este período, as células foram fixadas com 50 µL de ácido tricloroacético a 50% (TCA). Para completar a fixação celular, aguardou-se o tempo de 1 hora e, em seguida, as placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água destilada, para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Após lavagem, as placas foram mantidas em temperatura ambiente até a secagem completa.

Posteriormente, as placas foram coradas pela adição de 50 µL por poço do corante proteico sulforrodamina B (SRB) a 0,4%, dissolvido em ácido acético a 1% e incubadas a 4°C, durante 30 minutos. Após esse período, as placas foram lavadas por 4 vezes consecutivas com solução de ácido acético 1%. Após secagem à temperatura ambiente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com solução de Trizma Base (10µM, pH 10,5). A

leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 540 nm em leitor de microplacas (SACOMAN *et al.*, 2008).

A sulforrodamina B é um corante proteico que se liga aos aminoácidos básicos das proteínas de células que estavam viáveis no momento da fixação. Por isso, quanto maior a quantidade de SRB ligada à proteína, menor a atividade citocida da amostra em teste (SKEHAN *et al.*, 1990). Utilizando a curva de concentração-resposta para cada linhagem celular, a GI_{50} (concentração necessária do extrato bruto hidroalcoólico da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan para que ocorra 50% de inibição de crescimento) foi determinada por meio de análise de regressão não-linear, através do software Origin 8.0 (OriginLab Corporation).

3.9 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA

3.9.1 Determinação do teor de compostos fenólicos

A determinação do conteúdo de flavonoides totais seguiu o método descrito por Meda *et al.* (2005). Foram adicionados a 5 mL de cada solução do extrato (em metanol) o mesmo volume de uma solução de cloreto de alumínio ($AlCl_3$) a 2% (em metanol). Aguardou-se o tempo de 10 minutos para realizar a leitura da absorbância a 415 nm em espectrofotômetro (Shimadzu[®] UV mini – 1240), contra um branco composto pela solução de $AlCl_3$. Utilizou-se para esta determinação uma curva de calibração obtida a partir de soluções de quercetina nas concentrações de 2, 4, 6, 8, 10, 13, 16, 19, 22, 26, 28 e 30 $\mu g/mL$. A concentração de flavonoides foi expressa em miligramas equivalentes de quercetina, sendo realizadas análises em triplicata.

Para a determinação do teor de polifenóis totais, utilizou-se o método proposto por Chandra e Mejía (2004). Adicionou-se 1 mL da solução aquosa do extrato a 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 1N, permanecendo a mistura em repouso durante 2 minutos. Em seguida, adicionou-se 2 mL de uma solução aquosa de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 20%. A mistura permaneceu em repouso por mais 10 minutos. Posteriormente, foi realizada a leitura da absorbância a 757 nm, contra um branco composto por água destilada, reagente de Folin-Ciocalteu e solução a 20% de Na_2CO_3 . A curva de

calibração foi obtida a partir de soluções de ácido gálico nas concentrações de 1, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 35, e 40 µg/mL. A concentração de polifenóis foi expressa em miligramas equivalentes de ácido gálico, sendo realizadas análises em triplicata.

O teor de taninos condensados foi quantificado utilizando-se o método de Makkar e Becker (1993), no qual 0,5 mL da amostra do extrato vegetal foi adicionado a 3 mL de uma solução de vanilina (4% em metanol). Em seguida, adicionou-se 1,5 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado (37%). A reação ocorreu em tubos de ensaio, mergulhados em água a cerca de 22 °C. A leitura foi feita a 500 nm, contra um branco composto pela solução de vanilina, HCl e uma solução de etanol 50% em água. A curva de calibração para este ensaio foi realizada utilizando-se soluções de catequina nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 µg/mL. A concentração de taninos condensados foi expressa em miligramas equivalentes de catequina, sendo as análises realizadas em triplicata.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos com o ensaio de inibição de aderência ao biofilme, variável quantitativa discreta, foram submetidos à análise pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, o qual revelou ausência de distribuição normal. Dessa forma, a comparação do comportamento das substâncias testadas foi realizada por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIPROLIFERATIVO DA

Anadenanthera Colubrina (Vell.) Brenan

Rennaly de Freitas Lima¹, Érika Ponchet Alves¹, Pedro Luiz Rosalen², Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz³, Ana Cláudia Dantas de Medeiros¹, Edja Maria Melo de Brito Costa¹ Viviane, Josinete, Gustavo, Marta

¹*Departamento de Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), 58429-500 Campina Grande, PB, Brasil*

²*Departamento de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas (UNICAMP), 13414-903 Piracicaba, SP, Brasil*

³*Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Universidade de Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6171, 13083-970 Campinas, SP, Brasil*

Correspondência: Edja Maria Melo de Brito Costa – edjacosta@gmail.com

Resumo

Este estudo objetivou avaliar *in vitro* o potencial antimicrobiano e antiproliferativo do extrato e frações ativas da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (angico), além de caracterizar fitoquimicamente o extrato bruto. A avaliação antimicrobiana foi realizada através da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida/Fungicida Mínima e inibição de aderência ao biofilme, além da análise da morfologia celular por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para a verificação do potencial antiproliferativo, seis linhagens de células tumorais foram utilizadas. O extrato apresentou forte atividade antifúngica contra a *Candida albicans* ATCC 18804 (CIM = 0,031 mg/mL), sendo observada atividade semelhante para a sua fração de acetato de etila. O extrato e a fração ativa também demonstraram

capacidade de inibir a aderência da *Candida albicans* em biofilme, após 48 horas de formação, demonstrando valores de mediana equivalentes e maiores que o grupo controle, porém sem diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Observou-se ainda, através da MEV, alterações na morfologia celular da levedura. Em relação à atividade antiproliferativa, o extrato apresentou potencial citostático para todas as linhagens testadas. Diante destes resultados, sugere-se forte potencial de inibição antifúngica para *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, além de apresentar tendência à diminuição do crescimento celular para linhagens tumorais humanas.

1. Introdução

O crescente interesse da comunidade científica em pesquisa de terapias alternativas para o controle de doenças orais existe devido ao elevado número da doença na população e às limitações dos métodos disponíveis [1]. Dentro desse contexto, cresce o interesse por compostos de origem natural que apresentem boa efetividade, menos efeitos adversos e que possam ajudar no controle do biofilme oral, principal responsável pela formação de doenças como a cárie e a candidose [2].

É indiscutível o fato de que terapias para infecções bacterianas e fúngicas, principalmente em pacientes imunocomprometidos, representam um desafio para pesquisadores e clínicos. Diversos microrganismos apresentam resistência aos medicamentos disponíveis no mercado, sendo fundamental o desenvolvimento de estudos que contribuam na obtenção de fármacos naturais, seguros, estáveis, padronizados e eficientes frente à resistência adquirida por bactérias e fungos [3]. Diante disso, um maior número de pessoas pode se beneficiar em função da melhoria do custo e acesso aos medicamentos [4].

As plantas medicinais tornaram-se importante fonte para descoberta de novos antimicrobianos, sendo demonstrado seu potencial e de suas substâncias isoladas frente a diversos patógenos [5]. Após a constatação de atividade biológica contra microrganismos, é importante que se conheça o potencial do produto natural em causar ou não danos às células normais ou neoplásicas do hospedeiro, para que um futuro uso terapêutico seja viável [6].

Estudos multidisciplinares, principalmente fitoquímicos e farmacológicos, tornam-se cada vez mais necessários em detrimento da utilização de plantas medicinais em todo o mundo [7]. A *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, conhecida popularmente como “angico” e pertencente à subfamília *Mimosoideae* (Leguminosae), é uma espécie arbórea que ocorre em vários biomas, encontrada desde o Nordeste do Brasil até a Bolívia, Argentina, Paraguai e Peru [8, 9]. A *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan é relatada como uma das plantas mais utilizadas na medicina popular, sendo empregada para tratar problemas respiratórios e inflamatórios, bem como para cura de diarreia, tosse, bronquite, gripe e dor de dente [10-14]. Trata-se de uma árvore nativa e a parte mais utilizada é sua casca, cuja disponibilidade não é limitada pelas variações climáticas [15].

Sendo assim, o objetivo do estudo foi avaliar o potencial antimicrobiano e antiproliferativo do extrato e frações da casca da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, gerando informações que agreguem valor científico ao material vegetal.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção do extrato hidroalcoólico e fracionamento

A planta foi coletada na região do semiárido paraibano, na Serra de Bodocongó, município de Queimadas (7° 22' 25" S, 35° 59' 32"W), na meso região da Borborema e micro região do Cariri Oriental, no mês de setembro. O espécime testemunho da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan encontra-se depositado na coleção do Herbário Manuel de Arruda Câmara (ACAM) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus I, Campina Grande, Paraíba (nº 667/ACAM). A casca da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (100g), seca e moída, foi imersa em álcool 80% (250 ml) por 48 horas, em temperatura ambiente. A mistura resultante foi filtrada e os resíduos imersos, por mais duas vezes, em álcool 80%. As três fases líquidas finais foram concentradas em rotaevaporador e, posteriormente, liofilizadas. Realizou-se o fracionamento do extrato, utilizando partição líquido-líquido, de acordo com gradiente de polaridade, obtendo-se frações (hexano, clorofórmio, acetato de

etila e aquosa). As frações foram monitoradas através da Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando-se o reagente anisaldeído, seguido de incubação a 100°C por 5 minutos.

2.2 Cepas de microrganismos e teste de suscetibilidade

Os microrganismos utilizados neste estudo foram *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10557, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Candida albicans* ATCC 18804. A atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico e frações da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan foi identificada pela determinação das concentrações mínimas inibitória (CIM), bactericida (CBM) e fungicida (CFM), de acordo com as normas Clinical and Laboratory Standards Institute [16, 17]. O teste foi realizado em microplacas de 96 poços contendo 100 µL/poço do meio de cultura específico (Brain Heart Infusion - Difco, Franklin Lakes, NJ, USAAs – para bactérias e RPMI 1640 - Angus Buffers & Biochemicals, Niagara Falls, NY, USA – para a levedura). As substâncias foram diluídas em álcool a 40% (8 mg/mL), transferidas para o primeiro poço, e realizada diluições seriadas para se obter concentrações entre 15,62 e 2000 µg/mL. Os controles positivos foram clorexidina 0,12% (Sigma-Aldrich®) e nistatina (Sigma-Aldrich®) e o controle negativo o álcool 40%. Os inóculos bacteriano ($1,0 \times 10^6$ UFC/mL) e fúngico ($5,0 \times 10^3$ UFC/mL) foram adicionados aos poços e as placas incubadas a 37°C por 24 horas. A CIM foi definida como a menor concentração do extrato ou fração que inibiu crescimento microbiano visível, confirmado pela resazurina 0,01% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para bactérias e pela mudança da coloração do meio RPMI 1640 para a levedura.

Para determinar CBM/CFM, uma alíquota de 50 µL de cada poço, com concentrações maiores que a CIM, foram subcultivadas em meio BHI Agar (bactérias) e Agar Sabouraud Dextrose (levedura), e incubadas a 37°C por 24 horas. As CBM/CFM foram definidas como a menor concentração que inibiu crescimento visível no meio sólido utilizado.

Os ensaios foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes. Ao final dos testes, foi identificada a fração ativa do extrato da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan.

2.3 Inibição de aderência ao biofilme

Os biofilmes foram produzidos em placas de 96 poços não tratadas (TPP). Para avaliar a aderência de células microbianas ao biofilme, inicialmente, 100 µl de uma suspensão microbiana contendo 10^5 UFC/mL (leveduras), cultivadas em meio de cultura específico e acrescido de 2% de sacarose, foram transferidos para cada poço da placa contendo concentrações entre 15,62 e 2000 µg/mL do extrato hidroalcoólico e fração ativa. Em seguida, a placa foi incubada por 48 horas a 37 °C, sob agitação de 75 rpm. Como controle negativo, três poços de cada placa foram manuseados seguindo a mesma metodologia, sem a adição dos tratamentos. Foi também incluído o controle positivo nistatina. Os ensaios foram realizados em triplicata em três experimentos independentes. Para a quantificação das células aderidas, os poços foram lavados com água destilada e secos à temperatura ambiente por 45 minutos. Posteriormente, em cada poço foram acrescentados 200 µL de solução aquosa de cristal violeta a 1% por 45 minutos. Em seguida, os poços foram lavados novamente com água destilada e descorados com 200 µL de etanol a 95%. Transcorridos 45 minutos, 150 µL da solução descorada de cada poço foi transferida para uma nova placa de 96 poços e a quantidade do cristal violeta mensurada a 525 nm em leitor de microplacas (SpectraMax 340 Tunable Microplate Reader; Molecular Devices Ltda). Os valores de absorvância das substâncias em teste foram subtraídos dos valores do controle negativo, de modo a avaliar a quantidade de células microbianas aderidas [18, 19].

2.4 Análise da Morfologia Celular

Para análise da morfologia celular, os biofilmes foram formados em lâminas de Lab-Tek (Nunc, Naperville, IL, USA), utilizando a mesma metodologia descrita anteriormente, e tratados com extrato e fração ativa nas

concentrações capazes de inibir o crescimento do microrganismo (CIM/CFM). As células foram fixadas com glutaraldeído 3% em solução tampão de fosfato (PBS), em temperatura ambiente, por 12 horas. Posteriormente, o biofilme foi desidratado com etanol em concentrações seriadas (50, 70, 90 e 100%), metalizado com ouro e observado através da microscopia eletrônica de varredura - MEV (JEOL JSM 5600LV, JEOL® Tokyo, Japan).

2.5 Ensaio antiproliferativo

Foram utilizadas linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCat) e seis linhagens celulares tumorais humanas: NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), 786-O (rim), NCI-H460 (pulmão), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (cólon) e K562 (medula óssea). As culturas foram realizadas em 5mL de meio RPMI 1640 (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA), adicionando-se ainda uma mistura de penicilina: estreptomicina (1000 U/mL:1000 mg/mL, 1mL/L RPMI). As culturas foram inseridas em placas de 96 poços (100 µl/poço) e expostas ao extrato hidroalcoólico e fração ativa, diluídos em dimetilsulfóxido de sódio na concentração de 0,1 g/mL (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), permanecendo por 24 horas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. A concentração final de DMSO não afetou a viabilidade celular. Antes (placa T₀) e após a adição da amostra (placa T₁), as células foram fixadas com ácido tricloroacético a 50% e a proliferação celular determinada pela quantificação espectrofotométrica (540 nm) do teor de proteínas, utilizando sulforrodamina B. Através da curva concentração-resposta para cada linhagem celular, a GI₅₀ (concentração necessária do extrato bruto hidroalcoólico da *Anadenanthera colubrina* Brenan para que ocorra 50% de inibição de crescimento) foi determinada por meio de análise de regressão não-linear, usando software Origin 8.0 (OriginLab Corporation).

2.6 Determinação do teor de flavonóides totais, polifenóis totais e taninos condensados

Para a determinação do conteúdo de flavonoides totais, foram adicionados ao extrato uma solução de cloreto de alumínio (AlCl_3) a 2%. Aguardou-se o tempo de 10 minutos e realizou-se a leitura da absorvância a 415 nm em espectrofotômetro (Shimadzu® UV mini – 1240). A curva de calibração foi obtida a partir de soluções de quercetina. A concentração de flavonoides foi expressa em miligramas equivalentes de quercetina [20].

Para a determinação do teor de polifenóis totais, adicionou-se solução aquosa do extrato ao reagente de Folin-Ciocalteu 1N, permanecendo a mistura em repouso durante 2 minutos. Em seguida, adicionou-se solução aquosa de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 20%, aguardando-se 10 minutos para realização da leitura da absorvância a 757 nm. A curva de calibração foi obtida a partir de soluções de ácido gálico. A concentração de polifenóis foi expressa em miligramas equivalentes de ácido gálico [21].

Para a verificação do teor de taninos condensáveis, o extrato vegetal foi adicionado a uma solução de vanilina, sendo acrescentado, posteriormente, ácido clorídrico (HCl) a 37%. A reação ocorreu em tubos de ensaio, mergulhados em água a cerca de 20°C. A leitura foi realizada a 500 nm e a curva de calibração obtida a partir de soluções de catequina. A concentração de polifenóis foi expressa em miligramas equivalentes de catequina [22].

Todos os experimentos para determinação do teor de compostos fenólicos foram realizados em triplicata.

2.7 Análise estatística

Foi realizada análise estatística dos dados obtidos no ensaio de inibição de aderência ao biofilme, variável quantitativa discreta, cujos dados foram inicialmente submetidos à análise pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, que revelou ausência de distribuição normal. Dessa forma, a comparação do comportamento das substâncias testadas foi realizada por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

Os valores da CIM e CBM/CFM para o extrato hidroalcoólico da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan estão representados na Tabela 1. A melhor atividade foi observada sobre a *Candida albicans*. A partir deste resultado, as frações do extrato foram testadas apenas sobre esta espécie, cujos resultados estão apresentados na Tabela 2. A fração que obteve melhor resultado foi a de acetato de etila (CIM=31,25 µg/mL), com caráter fungistático semelhante ao extrato.

Tabela 1 Concentrações Mínimas Inibitória, Bactericida e Fungicida do extrato hidroalcoólico da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan avaliado contra espécies de bactérias (ATCC) e *Candida albicans* (ATCC).

Microrganismos	<i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan	
	CIM (µg/mL)	CBM/CFM (µg/mL)
<i>Candida albicans</i> ATCC 18804	31,25	1000
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	2000	> 2000
<i>Streptococcus sanguis</i> ATCC 10557	2000	> 2000
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	2000	> 2000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	500	1000

Tabela 2 Concentrações Mínimas Inibitória e Fungicida para as frações do extrato da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan avaliado contra *Candida albicans* (ATCC).

Frações da <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan	<i>Candida albicans</i>	
	CIM (µg/mL)	CBM/CFM (µg/mL)
Acetato de etila	31,25	2000
Hexano	62,5	2000
Clorofórmio	125	2000
Aquosa	1000	2000

Em relação à inibição de aderência ao biofilme, foram testados o extrato da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan e sua fração de acetato de etila, os quais demonstraram comportamento equivalente, apresentando desempenho regular até a concentração corresponde ao valor da CIM (31,25 µg/mL). A *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan apresentou, para extrato bruto e fração ativa, medianas maiores que a nistatina, contudo, estes valores não possuíram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Figura 1).

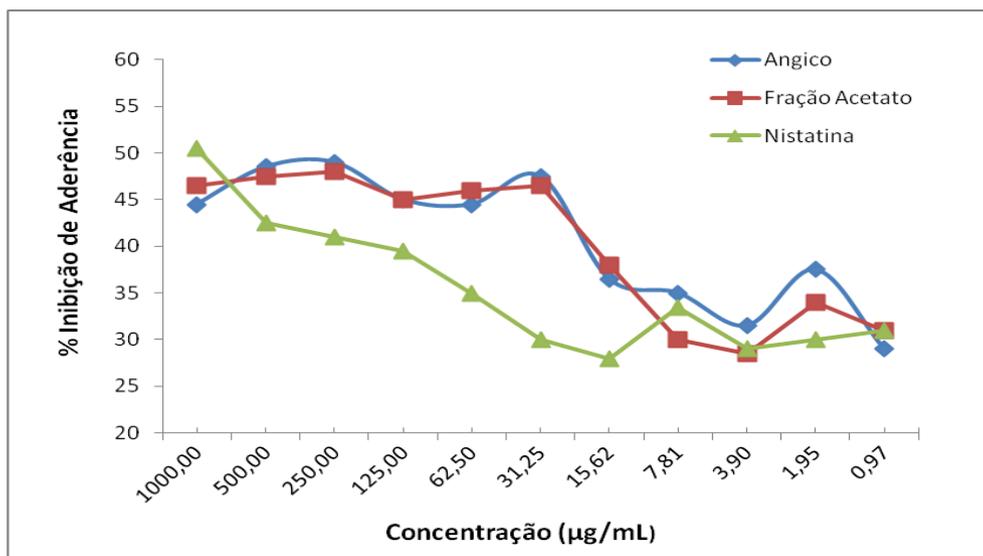


Figura 1. Efeito do extrato da *Anadenanthera colubrina* Brenan, da sua fração ativa e da nistatina sobre o biofilme amadurecido (48 horas).

As imagens em MEV demonstram o efeito do extrato (Figura 2) e fração ativa (Figura 3) nas concentrações da CIM e CFM sobre o biofilme de *Candida albicans*. Na Figura 4, estão representados o controle do microorganismo e o biofilme tratado com a nistatina. As imagens sugerem ocorrência de desestruturação na morfologia celular da *Candida albicans* pela utilização das substâncias em teste, detectando-se a presença de polimorfismo entre as células leveduriformes.

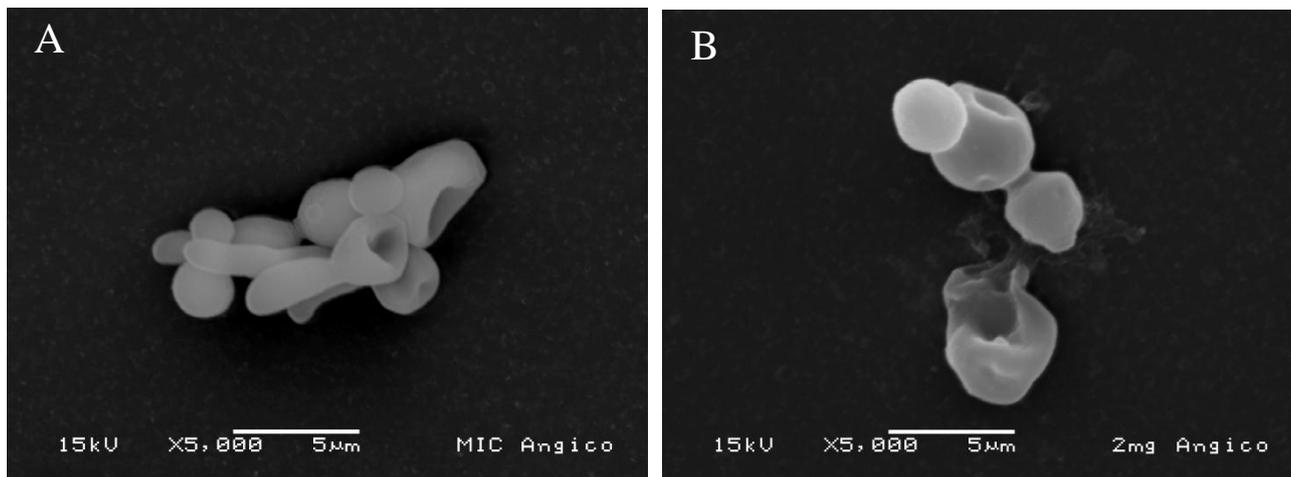


Figura 2. Microfotografia, por microscopia eletrônica de varredura, de biofilme de *Candida albicans* tratado com extrato de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, nas concentrações de 31,25 µg/mL (A) e 2000 µg/mL (B). (5000x)

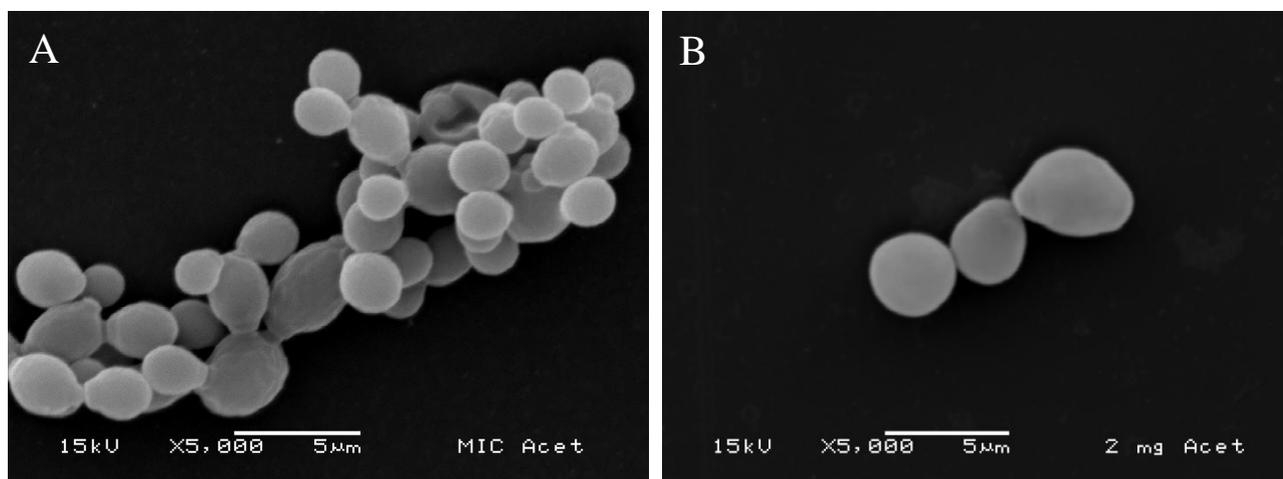


Figura 3. Microfotografia, por microscopia eletrônica de varredura, de biofilme de *Candida albicans* tratado com a fração de acetato de etila da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, nas concentrações de 31,25 µg/mL (A) e 2000 µg/mL (B). (5000x)

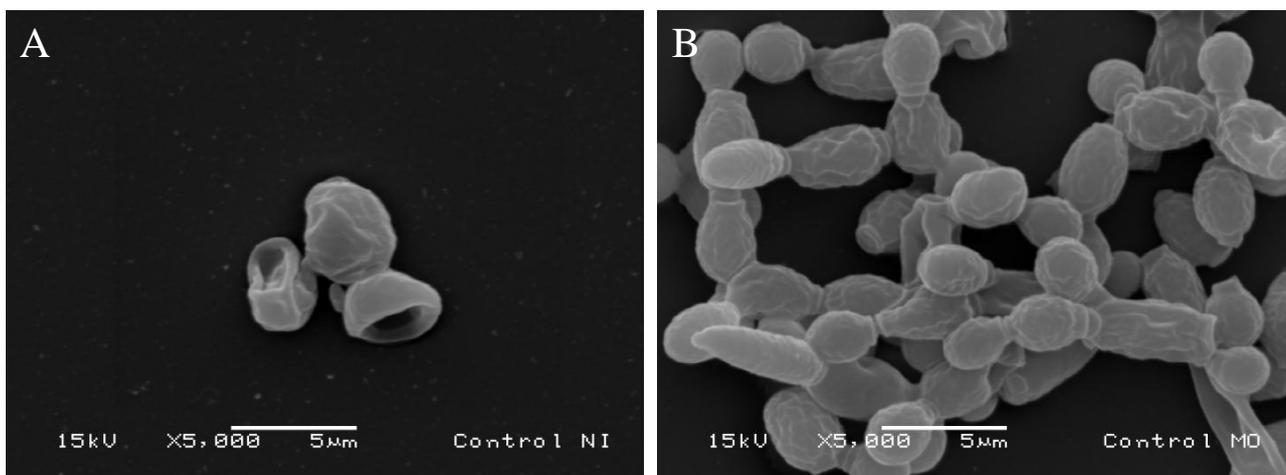


Figura 4. Microfotografia, por microscopia eletrônica de varredura, de biofilme de *Candida albicans* tratado com nistatina (A) e o controle negativo (B). (5000x)

Uma vez que extrato e fração demonstraram comportamento semelhante, o teste antiproliferativo foi realizado apenas com o extrato bruto. Observou-se que a *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan apresentou atividade citostática inespecífica, sendo capaz de diminuir o crescimento tumoral para todas as linhagens em uma concentração aproximada de 250 µg/mL, não apresentando, entretanto, atividade citocida. Os valores da inibição de crescimento em 50% estão na Tabela 3, observando-se que a média (Mean Log GI₅₀) foi de 1,81 µg/mL.

Tabela 3. Distribuição dos valores de inibição de crescimento celular em 50% (GI₅₀) para a *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, testado em culturas de células tumorais humanas.

Linhagens celulares	<i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan
	GI ₅₀ (µg/mL)
Ovário (NCI-ADR/RES)	61,3
Rim (786-0)	142,7
Pulmão (NCI-H460)	80,3
Ovário (OVCAR-3)	131,1
Cólon (HT29)	95,8
Leucemia (K562)	5,7
Queratinócitos (HaCat)	99,7
Mean log GI ₅₀	1,81

A caracterização fitoquímica evidenciou alto teor de polifenóis totais, sendo encontrado o valor de 53,18% equivalentes de ácido gálico. Para taninos, encontrou-se o valor de 8,77% equivalentes de catequina e, para flavonoides, de 0,28% equivalentes de quercetina.

4. DISCUSSÃO

Apesar da ampla utilização da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan pela população, poucos são os estudos que tentam comprovar cientificamente suas propriedades. É relatada sua ação efetiva como antiinflamatório, com

atividade antinoceptiva periférica, indicando a existência de compostos que possibilitem o desenvolvimento de agentes farmacológicos para o tratamento de inflamações e processos dolorosos [23]. Este estudo demonstrou resultados que indicam o seu potencial como antifúngico, em que o extrato e a fração ativa inibiram o crescimento da *Candida albicans* (CIM = 0,31 mg/mL), representando forte atividade antimicrobiana [24]. Observou-se ainda que a *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan demonstrou caráter fungistático, apresentando valores altos para CFM, entre 1-2 mg/mL, sugerindo inibição do crescimento do microrganismo sem causar sua morte, impedindo assim o surgimento de patógenos mais resistentes.

As espécies de *Candida* apresentam essencialmente dois tipos de crescimento, planctônico e biofilme, observando-se que este último proporciona vantagens de sobrevivência para a levedura sob condições ambientais desfavoráveis [25]. Biofilmes de *C. albicans* consistem em uma mistura de leveduras, hifas e pseudohifas, além de uma camada basal que sustenta o biofilme sobre a superfície, havendo uma matriz extracelular que mantém a estrutura unida [26]. A formação do biofilme se inicia com sua adesão a um substrato, seguida pela fase intermediária, onde o microrganismo altera sua morfologia de levedura para hifas ou pseudohifas. A última etapa corresponde à fase de maturação, aumentando o crescimento das hifas e diminuindo o das leveduras, sendo o biofilme envolto pela matriz extracelular [25-27]. Infecções por este microrganismo têm exibido aumento da resistência aos antifúngicos, conduzindo a falhas no tratamento e infecções recidivantes [28]. Os resultados do deste estudo representam possibilidades para desenvolvimento de novos antifúngicos, uma vez que o extrato e sua fração ativa demonstraram capacidade de inibição de formação de biofilme de *C. albicans*, com maiores medianas em relação à nistatina.

Através da observação em MEV, constatou-se que a *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan demonstrou capacidade de alterar a morfologia das células de *C. albicans*, verificando-se para extrato e fração ativa modificações nas paredes celulares do microrganismo, as quais se encontraram com maior lisura superficial, além da diminuição da quantidade de pseudohifas quando comparadas às estruturas íntegras. Uma característica deste microrganismo é a capacidade de produzir, sob condições menos favoráveis para o seu

crescimento, clamidósporos, ou seja, estruturas esféricas que apresentam uma parede celular densa e que se formam em resposta a mudanças de condições ambientais [29].

Tais resultados sugerem capacidade de desestruturação na forma da parede celular das células leveduriformes analisadas, determinando a susceptibilidade do biofilme dessa espécie à *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. A parede celular possui papel fundamental e é essencial a quase todos os aspectos da biologia e patogenicidade celular das leveduras. Age como uma barreira de permeabilidade e é a sua estrutura que mantém a forma de levedura e desempenha um papel mediador nas interações que se estabelecem entre o microrganismo e o ambiente que o rodeia [30].

A nistatina é um antifúngico polieno que possui excelente atividade fungicida *in vitro* contra *C. albicans* spp. Atua, primeiramente, ligando seus polienos ao ergosterol, um componente presente nas membranas celulares da *C. albicans*, resultando na formação de poros transmembranares, fuga de íons e sequestro do ergosterol. Posteriormente, ocorre a indução do stress oxidativo e deteriorização da membrana, contribuindo para a atividade antifúngica [31, 32]. Considerando a alteração na morfologia da célula tratada com o extrato, é possível que o mecanismo de ação da nistatina seja diferente daquele da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan.

Após a determinação da atividade antimicrobiana de um produto natural, é importante verificar se ele também possui atividade antiproliferativa. A descoberta de fármacos derivados de plantas medicinais possui papel significativo no tratamento do câncer, verificando-se que, de todos os fármacos antitumorais disponíveis entre 1940 e 2002, 40% foi originado de produtos naturais ou semissintéticos [33].

De acordo com os critérios da National Cancer Institute (NCI/EUA) para classificação da atividade antiproliferativa, considera-se que o produto é inativo quando possui média maior que 1,5 [34]. A *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan apresentou uma média de 1,81, indicando ausência de atividade antiproliferativa contra as linhagens tumorais testadas, mostrando, entretanto, tendência à diminuição do crescimento celular, principalmente para células causadoras da leucemia. Também se observou ausência de atividade sobre a linhagem não tumoral (queratinócitos), indicando um perfil não tóxico sobre

células normais. Apesar de não ter apresentado atividade citocida, o extrato foi capaz de inibir o crescimento das células de forma inespecífica, caracterizando-se como citostático.

O extrato da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan apresentou também interessante resultado sobre a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (CIM = 0,5 mg/mL). O surgimento de *P. aeruginosa* como patógeno humano oportunista durante o século passado pode ser consequência de sua resistência aos antibióticos, verificando-se que esta é considerada como importante fonte de bacteremia e causa predominante de morbidez e mortalidade em pacientes, por exemplo, com fibrose cística [35].

A análise fitoquímica confirmou abundante presença de compostos fenólicos na *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, os quais usualmente são relacionados com as atividades farmacológicas das plantas. Autores demonstraram em triagens fitoquímicas para a casca da *Anadenanthera colubrina* presença de catequinas, flavonoides, fenóis, saponinas, esteroides, taninos, triterpenos e xantonas, sugerindo possibilidade de participação dos metabólitos secundários na atividade biológica conferida à planta [23].

Verificou-se, neste estudo, presença de 53,18% de polifenóis no extrato da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. Tem sido sugerido que esta substância possui a capacidade de provocar instabilidade metabólica na *C. albicans*, além de destruir a atividade enzimática de proteossomas, contribuindo para a redução da taxa de crescimento do microrganismo e da formação e maturação do biofilme [36]. A expressiva quantidade de polifenóis na *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan pode explicar os resultados encontrados na análise de inibição do biofilme.

Futuros estudos são necessários para se determinar o mecanismo de ação da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan sobre a *C. albicans*, uma vez que existem indícios da real eficácia desta planta como antifúngico, sendo importante também o teste desta substância sobre outras espécies do gênero.

5. CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que a *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan possui compostos que proporcionam forte atividade antifúngica, a qual foi

capaz de inibir o crescimento celular e a formação do biofilme de *Candida albicans*, causando consideráveis alterações morfológicas na estrutura deste microrganismo. Em relação à atividade antiproliferativa, o extrato apresentou capacidade de diminuição do crescimento de células tumorais, além de ser inativo contra células normais. Diante disto, a potencialidade desta planta para desenvolvimento de novos fármacos é evidente, sendo necessária a investigação dos mecanismos envolvidos na ação deste extrato.

REFERÊNCIAS

- [1] S. G. Leitão, O. Castro, E. N. Fonseca et al., "Screening of Central and South American plant extracts for antimycobacterial activity by the Alamar Blue test," *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol.16, no. 1, pp. 6-11, 2006.
- [2] S. H. Abdollahzadeh, R. Y. Mashouf, H. Mortazavi et al., "Antibacterial and Antifungal Activities of Punica Granatum Peel Extracts Against Oral Pathogens," *Journal of Dentistry*, vol. 8, no. 1, 2011.
- [3] M. A. M. Maciel, A. C. Pinto, and V. F. Veiga Jr, "Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares," *Quimica nova*, vol. 25, no. 3, pp. 419-438, 2002.
- [4] E. L. C. Amorim, C. S. A. Lima, J. S. Higino, L. R. S. Silva, and U. P. Albuquerque, "Phytotherapy: instrument for a better quality of life," *Infarma*, vol. 15, no. 13, pp. 66-69, 2003.
- [5] S. M. K. Rates, "Plants as source of drugs," *Toxicon*, vol. 39, pp. 603–613. 2001.
- [6] I. Rodeiro, L. Cancino, J. E. González et al., "Evaluation of the genotoxic potential of *Mangifera indica* L. extract (Vimang), a new natural product with antioxidant activity," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 44, no. 10, pp. 1707-1713, 2006.
- [7] V. F. Veiga Jr, A. C. Pinto, and M. A. Maciel, "Plantas medicinais: Cura segura?," *Química Nova*, vol. 28, no. 3, pp. 519-528, 2005.
- [8] A. C. C. Rodrigues and J. T. A. OSUNA, "Mudanças morfométricas em sementes na espécie Angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* [Griseb.] Altschul) em diferentes condições ambientais," *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 14, pp. 35-36, 2004.
- [9] C. F. Nepomuceno, A. P. S. Rios, S. R. O. D. Queiroz et al., "Controle da Abscisão Foliar e Morfogênese *In Vitro* em Culturas de *Anadenanthera*

colubrina (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschul,” *Revista Árvore*, vol. 31, no. 5, pp. 967-975, 2007.

[10] J. M. Monteiro, U. P. Albuquerque, E. M. F. Lins-Neto et al., “Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil’s semi-arid northeastern region,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 105, pp. 173–186, 2006.

[11] C. F. C. B. R. Almeida, E. L. C. Amorim, U. P. Albuquerque, and M. B. S. Maia, “Medicinal plants popularly used in the Xingó region – a semiarid location in Northeastern Brazil,” *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, vol. 2, pp. 1-7, 2006.

[12] M. F. Agra, P. F. Freitas, and J. M. Barbosa-Filho, “Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil,” *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 17, pp.114–140, 2007.

[13] M. F. Agra, K. N. Silva, I. J. L. D. Basilio, P. F. Freitas, and J. M. Barbosa-Filho, “Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil,” *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 18, pp. 472–508, 2008.

[14] T. A. S. Araújo, N. L. Alencar, E. L. C. Amorim, and U. P. Albuquerque, “A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 120, pp. 72–80, 2008.

[15] U. P. Albuquerque, R. F. P. Lucena, J. M. Monteiro, A. T. N. Florentino, and C. F. C. B. R. Almeida, “Evaluating two quantitative ethnobotanical techniques,” *Ethnobotany Research & Applications*, vol. 4, pp. 51–60, 2006.

[16] Clinical and Laboratory Standards Institute, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard*, vol. 29, no. 2, CLSI document M07-A8, Wayne, Pa, USA, 8th edition, 2009.

[17] Clinical and Laboratory Standards Institute, *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard*, vol. 28, no. 14, CLSI document M27-A3, Wayne, PA, USA, 3rd edition, 2008.

[18] X. Li, Z. Yan, and J. Xu, “Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*,” *Microbiology*, vol. 49, pp. 353–362, 2003.

[19] D. Djordjevic, M. Wiedmann, and L. A. McLandsborough, “Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation,” *Microbiology*, vol. 29, pp. 50–58, 2002.

[20] A. Meda, C. E. Lamien, M. Romito, J. Millogo, and O. G. Nacoulma, “Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina

Fasan honey, as well as their radical scavenging activity," *Food Chemistry*, vol. 91, pp. 571-577, 2005.

[21] S. Chandra, and G. Mejía, "Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Quinone Reductase Activity of an Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in Comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (Camellia sinensis) Teas," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 52, pp. 3583-3589, 2004.

[22] H. P. S. Makkar, and K. Becker, "Vanillin-HCl method for condensed tannins: Effect of organic solvents used for extraction of tannins," *Journal of Chemical Ecology*, vol. 19, no. 4, 1993.

[23] J. S. Santos, R. R. Marinho, E. Ekundi-Valentim, et al., "Beneficial effects of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan extract on the inflammatory and nociceptive responses in rodent models," *Journal of Ethnopharmacology*, 2013.

[24] N. Aligiannis, E. Kalpotzakis, S. Mitaku, and I. B. Chinou, "Composition and antimicrobial activity of essential oil of two *Origanum* species," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 40, pp. 4168 -4170, 2001.

[25] M. Iñigo, J. Pemán, and J. L. D. Pozo, "Antifungal activity against *Candida* biofilms," *International journal of artificial organs*, vol. 35, no. 10, pp. 780-791, 2012.

[26] J. R. Blankenship, and A. P. Mitchell, "How to build a biofilm: a fungal perspective," *Current opinion in microbiology*, vol. 9, no. 6, pp. 588-594, 2006.

[27] J. Chandra, D. M. Kuhn, P. K. Mukherjee, L. L. Hoyer, T. McCormick, and M. A. Ghannoum, "Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance," *Journal of bacteriology*, vol. 183, no. 18, pp. 5385-5394, 2001.

[28] T. Watamoto, L. P. Samaranayake, J. A. Jayatilake, H. Egusa, H. Yatani, and C. J. Seneviratne, "Effect of filamentation and mode of growth on antifungal susceptibility of *Candida albicans*," *International journal of antimicrobial agents*, vol. 34, pp. 333–339, 2009.

[29] C. O. Mosca, M. D. Moragues, J. Llovo, A. Mosaid, D. C. Coleman, and J. Ponton, "Casein Agar: a Useful Medium for Differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 41, pp. 1259-1262, 2003.

[30] W. L. Chaffin, J. L. López-Ribot, M. Casanova, D. Gozalbo, and J. P. Martinez, "Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans*: Identification, Function and Expression," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 62, no. 1, pp. 130-180, 1998.

[31] A. J. Carrillo-Muñoz, G. Quindós, C. Tur et al., "In vitro antifungal activity of liposomal nystatin in comparison with nystatin, amphotericin B cholesteryl

sulphate, liposomal amphotericin B, amphotericin B lipid complex, amphotericin B desoxycholate, fluconazole and itraconazole," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 44, pp. 397-401, 1999.

[32] P. Kovacic, and A. Cooksy, "Novel, unifying mechanism for amphotericin B and other polyene drugs: electron affinity, radicals, electron transfer, autoxidation, toxicity, and antifungal action," *Medicinal chemistry communications*, vol. 3, pp. 274-280, 2012.

[33] M. S. Butler, "The role of natural product chemistry in drug discovery," *Journal of Natural Products*, vol. 67, no. 12, pp. 2141-2153, 2004.

[34] G. Fouche, G. M. Cragg, P. Pillay, N. Kolesnikova, V. J. Maharaj, and J. Senabe, "*In vitro* anticancer screening of South African plants," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 119, no. 3, pp. 455–461, 2008.

[35] C. K. Stover, X. Q. Pham, A. L. Erwin et al., "Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen," *Nature*, vol. 406, pp. 959-964, 2000.

[36] N. A. Evensen and P. C. Braun, "The effects of tea polyphenols on *Candida albicans*: inhibition of biofilm formation and proteasome inactivation," *Canadian journal of microbiology*, vol. 55, pp. 1033-1039, 2009.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo apresentaram o potencial antimicrobiano do extrato e da fração ativa de acetato de etila da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, com capacidade de inibição antifúngica considerada forte para a *Candida albicans*. Em relação à inibição da formação de biofilme, o extrato e sua fração ativa apresentaram dados superiores aos da nistatina, porém sem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Adicionalmente, tanto o extrato como a fração ativa promoveram alteração na morfologia celular da *C. albicans*, com polimorfismos nas células leveduriformes. Esta alteração, possivelmente, contribuiu para a menor aderência das células ao biofilme. Em relação à atividade antiproliferativa, o extrato da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan provocou inibição inespecífica do crescimento celular para todas as linhagens tumorais testadas, no entanto, não apresentou potencial citocida. A caracterização fitoquímica revelou alto teor de compostos fenólicos, os quais usualmente são relacionados às atividades farmacológicas das plantas. Tais resultados representam interessantes possibilidades para desenvolvimento de novos antifúngicos, sendo necessária a investigação dos reais mecanismos envolvidos na ação deste extrato, além de estudos de citotoxicidade e genotoxicidade. É válido ressaltar que, apesar da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan ter apresentado forte potencial antimicrobiano para uma linhagem de *C. albicans*, outros estudos são necessários para reafirmar este potencial, utilizando outras cepas padrão e isolados clínicos, além de microrganismos de infecções resistentes.

REFERÊNCIAS GERAIS

ABDOLLAHZADEH, S.H. *et al.* Antibacterial and Antifungal Activities of Punica Granatum Peel Extracts Against Oral Pathogens. **Journal of Dentistry**, v. 8, n. 1, 2011.

AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, p.114–140, 2007.

AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASILIO, I.J.L.D.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 472–508, 2008.

AMORIM, E.L.C.; LIMA, C.S.A.; HIGINO, J.S. *et al.* Phytotherapy: instrument for a better quality of life. **Infarma**, v. 15, n. 13, p. 66-69, 2003.

CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 314-319, 2008.

CARVALHO, D.D.C.; ALVES, E.; CAMARGOS, R.B. *et al.* Plant extracts to control *Alternaria alternata* in Murcott tangor fruits. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 28, n. 4, p. 173–178, 2011.

CHANDRA, S.; MEJÍA, G. Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Quinone Reductase Activity of an Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in Comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3583-3589, 2004.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard, vol. 28, no. 14, CLSI document M27-A3, Wayne, PA, USA, 3ª edição, 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard, vol. 29, no. 2, CLSI document M07-A8, Wayne, Pa, USA, 8ª edição, 2009.

DJORDJEVIC, D.; WIEDMANN, M.; MCLANDBOROUGH, L.A. Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. **Microbiology**, v. 29, p. 50–58, 2002.

GUTIERREZ-LUGO, M.T.; DESCHAMPS, J.D.; HOLMAN, T.R. *et al.* Lipoxygenase inhibition by anadanthoflavone, a new flavonoid from the aerial parts of *Anadenanthera colubrina*. **Planta Medica**, v.70, p. 263-265, 2004.

JEON, J.G.; ROSALEN, P.L.; FALSETTA, M.L. *et al.* Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. **Caries Research**, v.45, n.3, p.243-263, 2011.

LI, X.; YAN, Z.; XU, J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 49, p. 353–362, 2003.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR, V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quimica nova**, v. 25, n. 3, p. 419-438, 2002.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Vanillin-HCl method for condensed tannins: Effect of organic solvents used for extraction of tannins. **Journal of Chemical Ecology**, n. 4, v. 19, 1993.

MEDA, A.; LAMIEN, C.E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOULMA, O.G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, p. 571-577, 2005.

MONTEIRO, J.M. *et al.* Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 173–186, 2006a.

MONTEIRO, J.M.; ALMEIDA, C.F.C.B.R.; ALBUQUERQUE, U.P. *et al.* Use and traditional management of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan in the semi-arid region of northeastern Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 2, n. 6, 2006b.

NEPOMUCENO, C.F. *et al.* Controle da Abscisão Foliar e Morfogênese *In Vitro* em Culturas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschul. **Revista Árvore**, v. 31, n. 5, p. 967-975, 2007.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v.70, p.461–477, 2007.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Microbial antitumor drugs: natural products of microbial origin as anticancer agents. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v.10, n.12, p.1280-1296, 2009.

RODEIRO, I; CANCINO, L.; GONZÁLEZ, J.E. *et al.* Evaluation of the genotoxic potential of *Mangifera indica* L. extract (Vimang), a new natural product with antioxidant activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 10, p. 1707-1713, 2006.

RODRIGUES, A.C.C.; OSUNA, J.T.A. Mudanças morfométricas em sementes na espécie Angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* [Griseb.] Altschul) em diferentes condições ambientais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14 (Supl 01), p. 35-36, 2004.

SACOMAN, J.; MONTEIRO, K.M.; POSSENTI, A.; FIGUEIRA, G.M.; FOGLIO, M.A.; CARVALHO, J.E. Cytotoxicity and antitumoral activity of dichloromethane extract and its fractions from *Pothomorphe umbellata*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p. 411-415, 2008.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D. *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancerdrug screening. **Journal of National Cancer Institute**, v. 82, p. 1107-1118, 1990.

ANEXO A - Normas do periódico Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, Qualis A2

Author Guidelines

Submission

Manuscripts should be submitted by one of the authors of the manuscript through the online [Manuscript Tracking System](#). Regardless of the source of the word-processing tool, only electronic PDF (.pdf) or Word (.doc, .docx, .rtf) files can be submitted through the MTS. There is no page limit. Only online submissions are accepted to facilitate rapid publication and minimize administrative costs. Submissions by anyone other than one of the authors will not be accepted. The submitting author takes responsibility for the paper during submission and peer review. If for some technical reason submission through the MTS is not possible, the author can contact ecam@hindawi.com for support.

Terms of Submission

Papers must be submitted on the understanding that they have not been published elsewhere and are not currently under consideration by another journal published by Hindawi or any other publisher. The submitting author is responsible for ensuring that the article's publication has been approved by all the other coauthors. It is also the authors' responsibility to ensure that the articles emanating from a particular institution are submitted with the approval of the necessary institution. Only an acknowledgment from the editorial office officially establishes the date of receipt. Further correspondence and proofs will be sent to the author(s) before publication unless otherwise indicated. It is a condition of submission of a paper that the authors permit editing of the paper for readability. All enquiries concerning the publication of accepted papers should be addressed to ecam@hindawi.com.

Peer Review

All manuscripts are subject to peer review and are expected to meet standards of academic excellence. Submissions will be considered by an

editor and “if not rejected right away” by peer-reviewers, whose identities will remain anonymous to the authors.

Article Processing Charges

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine is an open access journal. Open access charges allow publishers to make the published material available for free to all interested online visitors. For more details about the article processing charges of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, please visit the [Article Processing Charges](#) information page.

Units of Measurement

Units of measurement should be presented simply and concisely using System International (SI) units.

Title and Authorship Information

The following information should be included

- Paper title
- Full author names
- Full institutional mailing addresses
- Email addresses

Abstract

The manuscript should contain an abstract. The abstract should be self-contained and citation-free and should not exceed 200 words.

Introduction

This section should be succinct, with no subheadings.

Materials and Methods

This part should contain sufficient detail so that all procedures can be repeated. It can be divided into subsections if several methods are described.

Results and Discussion

This section may each be divided by subheadings or may be combined.

Conclusions

This should clearly explain the main conclusions of the work highlighting its importance and relevance.

Acknowledgments

All acknowledgments (if any) should be included at the very end of the paper before the references and may include supporting grants, presentations, and so forth.

References

Authors are responsible for ensuring that the information in each reference is complete and accurate. All references must be numbered consecutively and citations of references in text should be identified using numbers in square brackets (e.g., “as discussed by Smith [9]”; “as discussed elsewhere [9, 10]”). All references should be cited within the text; otherwise, these references will be automatically removed.

Preparation of Figures

Upon submission of an article, authors are supposed to include all figures and tables in the PDF file of the manuscript. Figures and tables should not be submitted in separate files. If the article is accepted, authors will be asked to provide the source files of the figures. Each figure should be supplied in a separate electronic file. All figures should be cited in the paper in a consecutive order. Figures should be supplied in either vector art formats (Illustrator, EPS, WMF, FreeHand, CorelDraw, PowerPoint, Excel, etc.) or bitmap formats (Photoshop, TIFF, GIF, JPEG, etc.). Bitmap images should be of 300 dpi resolution at least unless the resolution is intentionally set to a lower level for scientific reasons. If a bitmap image has labels, the image and labels should be embedded in separate layers.

Preparation of Tables

Tables should be cited consecutively in the text. Every table must have a descriptive title and if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Vertical rules should not be used.

Proofs

Corrected proofs must be returned to the publisher within 2-3 days of receipt. The publisher will do everything possible to ensure prompt publication. It will therefore be appreciated if the manuscripts and figures conform from the outset to the style of the journal.

Copyright

Open Access authors retain the copyrights of their papers, and all open access articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited.

The use of general descriptive names, trade names, trademarks, and so forth in this publication, even if not specifically identified, does not imply that these names are not protected by the relevant laws and regulations.

While the advice and information in this journal are believed to be true and accurate on the date of its going to press, neither the authors, the editors, nor the publisher can accept any legal responsibility for any errors or omissions that may be made. The publisher makes no warranty, express or implied, with respect to the material contained herein.

Disclosure Policy

A competing interest exists when professional judgment concerning the validity of research is influenced by a secondary interest, such as financial gain. We require that our authors reveal all possible conflicts of interest in their submitted manuscripts.