



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

ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTIBIOFILME E ANTIPROLIFERATIVA
DO EXTRATO DE *Guapira graciliflora* Mart. E DO ÓLEO ESSENCIAL DE
***Schinus terebinthifolius* Raddi**

ÉRIKA PONCHET ALVES

Campina Grande – PB

2015

ÉRIKA PONCHET ALVES

ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTIBIOFILME E ANTIPROLIFERATIVA
DO EXTRATO DE *Guapira graciliflora* Mart. E DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Schinus terebinthifolius Raddi

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

2015

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.

A474a Alves, Érika Ponchet.

Atividades antimicrobiana, antibiofilme e antiproliferativa do extrato de Guapira Graciliflora Mart. e do óleo essencial de Schinus Terebinthifolius Raddi [manuscrito] / Érika Ponchet Alves. - 2015.

88 p. : il. color.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2015.

"Orientação: Profª. Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa, Departamento de Odontologia".

1. Plantas medicinais. 2. Schinus Terebinthifolius Raddi - Aroeira. 3. Guapira Graciliflora Mart - João-mole. 4. Medicamentos Antitumorais. I. Título.

21. ed. CDD 615.321

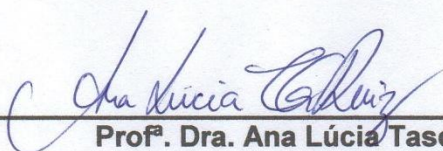
ÉRIKA PONCHET ALVES

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIBIOFILME E ANTIPROLIFERATIVA DO
EXTRATO DA *Guapira graciliflora* Mart. E DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Schinus*
terebinthifolius Raddi

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.

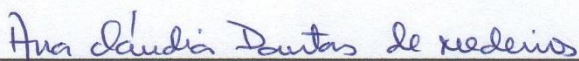
Aprovada em: 31/07/2015

BANCA EXAMINADORA



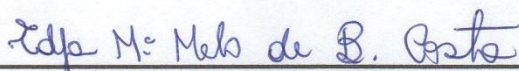
Prof.^a Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz/ UNICAMP

Membro Titular (Examinadora Externa)



Prof.^a Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros/ UEPB

Membro Titular (Examinadora Interna)



Prof.^a Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa/ UEPB

Membro Titular (Orientadora)

DEDICATÓRIA

Dedicatória

À minha mãe Lúcia de Fátima, que sempre foi a minha maior incentivadora, dedico este trabalho!

À minha filha Mariah Ponchet que tem sido a minha maior inspiração, dedico este trabalho!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradecimentos Especiais

*Agradeço primeiramente a **Deus**, que tem sido minha fortaleza nos momentos de dificuldade e minha força constante nos momentos de fraqueza.*

*À minha **família**, que além de todo incentivo, tem me dado todo suporte para que eu pudesse continuar me dedicando aos estudos. E certamente tem se orgulhado a cada degrau alcançado e a cada vitória conquistada. A você **“Mainha” (Lúcia de Fátima Ponchet Alves)**, dedico o meu agradecimento especial, por sempre ter acreditado nos meus sonhos e sonhado junto comigo para que cada um deles se tornasse realidade.*

*À minha querida e amada filha, **Mariah Ponchet S. Alves de Andrade**, que tem sido o principal motivo para me fazer melhorar sempre mais como mãe, pessoa e profissional. A você Mamazinha, agradeço a oportunidade de me fazer sentir o maior amor do mundo, e me fazer uma pessoa mais feliz sempre que vejo o seu sorriso. Mamãe te ama imensuravelmente.*

*Ao meu noivo **Paulo Fernando T. Almeida**. Sempre me entendeu, ajudou, incentivou e acima de tudo, foi meu porto seguro quando precisei de apoio. A você amor, dedico os meus sentimentos mais puros e sinceros. A você dedico sempre minhas conquistas, pois você faz parte de cada uma delas. A você, meu querido amor, dedico a minha melhor parte, por sempre cultivar o que eu tenho de melhor. Você faz parte de mais essa conquista e fará parte de todas as outras que ainda estão por vir. Juntos somos sempre mais fortes.*

*E por fim, a minha querida orientadora **Edja Maria M. B. Costa**, que além de professora-orientadora desempenhou um papel muito importante na minha vida: O exemplo que quero seguir. Para a senhora, me faltam palavras para expressar o tamanho da gratidão que sinto sempre que olho para traz e vejo o que conquistei até hoje. Sempre tiveste papel essencial para meu crescimento, como aluna, amiga, mãe, mulher e principalmente na profissional que estou me tornando. Tenho sua vida e sua carreira como exemplo para a minha vida, e o seu caráter como exemplo de que pessoas do bem sempre carregam consigo o amor divino, amor que só Ele é capaz de nos dá. Obrigada*

Professora, pela amizade, por sempre compreender as situações com olhar humano e principalmente por me transformar em um ser humano melhor desde que comecei a conviver com a senhora. Muito obrigada por tudo!

A todos meu agradecimento especial!

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

Inicialmente ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba pela oportunidade e incentivo para o meu crescimento profissional.

Á todos os professores do Programa que contribuíram de forma direta com os conhecimentos ofertados e amizade oferecida.

Aos meus colegas de turma que acompanharam a minha luta e dividiram comigo as dificuldades. Guardo todos de forma especial e tenho certeza que as amizades feitas nesse período se perdurarão durante muito tempo. Em especial ao meu amigo Arley Leitão, que sempre esteve disposto a me ajudar quando precisei e nunca hesitou em está ao meu lado quando se fez necessário, desde o processo de seleção, até aqui. Muito obrigada por tudo!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD) pelo auxílio financeiro e oportunidade em aprender em outra instituição.

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), centro de pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) no nome da Dr^a Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz, Dr^a Marta Cristina Teixeira Duarte e Dr^a Vera Lúcia Garcia, pelo acolhimento e imenso auxílio na realização deste trabalho. As grandes amizades que contribuíram de forma direta e indireta para o desenvolvimento do mesmo as quais menciono: Mariana Figueiredo, Giovanna Fiorito, Humberto Spindola, Karin Maia, Sirlene Valério, Paula Pereira, Paula Monteiro, Ana Possentti, Ana Paula Oliveira, Larissa Shiozawa. Muito obrigada pelos esclarecimentos as minhas dúvidas, as caronas dadas, as sugestões para melhorar, enfim, obrigada principalmente pela disponibilidade e educação de sempre. A todos minha sincera gratidão!

As minhas grandes amigas e colegas de pesquisa Rennaly Lima e Carolina Medeiros, pela companhia, ajuda diária, compreensão e principalmente disponibilidade, sempre que precisei de auxílio ou até mesmo

de uma palavra amiga. Sem esquecer as queridas Cibelle Aleixo, Priscilla Guimarães e Larissa Rodrigues, que além de colegas de pesquisa, se tornaram grandes amigas também. Agradeço imensamente a nosso grupo de pesquisa pela dedicação e amor ao que fazem. Nos tornamos, além de colegas de trabalho, companheiras de vida. Certamente nossos elos se estreitaram bastante com todo esse tempo de convivência. Tenho muito orgulho de fazer parte desse grupo de pesquisa.

As amigas Arella Cristina Muniz Brito e Tereza Karla Vieira Lopes da Costa, pela disponibilidade em viajar comigo para Campinas, a fim de realizarem esse trabalho em equipe. Agradeço pela dedicação, companhia e principalmente pelo carinho que tiveram em doar o melhor de si para que tudo saísse da melhor maneira. Não teria conseguido sem a ajuda de vocês.

Aos colegas do LABDEM em nome da Prof.^a Dr^a Ana Cláudia Medeiros, sempre com muita atenção e presteza, não hesitaram em me ajudar quando necessitei, obrigada!

“Porque sou Eu que conheço os planos que tenho para vocês, diz o Senhor, planos de fazê-los prosperar e não de lhes causar dano, planos de dar-lhes esperança e um futuro.”

(Jr. 29:11)

RESUMO

Resumo

As plantas medicinais representam uma fonte promissora de compostos ativos, que podem ser utilizados no desenvolvimento de novos fármacos. Existe uma diversidade de plantas que são usadas pela população para fins terapêuticos, dentre elas, encontram-se a *Guapira graciliflora* Mart., popularmente conhecida como João-mole, e a *Schinus terebinthifolius* Raddi, conhecida como aroeira-da-praia. Essas plantas se destacam na medicina popular em função das suas propriedades terapêuticas em processos inflamatórios e infecciosos. Este estudo avaliou *in vitro* as atividades antimicrobiana e antiproliferativa, além da toxicidade, e da composição química do extrato hidroalcoólico das folhas da *G. graciliflora* e do óleo essencial dos frutos verdes da *S. terebinthifolius*. A atividade antimicrobiana foi avaliada por meio da técnica de microdiluição em caldo, com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida/Fungicida Mínima (CBM/CFM), frente às cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11775 e *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, e a levedura *Candida albicans* ATCC 10231. Foi analisada a ação das duas amostras vegetais sobre o biofilme monoespécie de *C. albicans*, de 48 horas, por meio da contagem de UFC/mL e análise da morfologia celular em microscópio de fluorescência (MF), usando o Calcofluor White. A atividade antiproliferativa foi realizada contra nove linhagens de células tumorais humanas (U251, MCF7, NCI/ADR-RES, 786-0, NCI-460, HT29, K562, PC-03 e OVCAR-3) e uma linhagem não tumoral de queratinócitos (HaCat). Para o teste de toxicidade preliminar, realizou-se o ensaio de hemólise. A análise fitoquímica do extrato da *G. graciliflora* foi realizada através da Cromatografia de Camada Delgada, e a do óleo essencial da *S. terebinthifolius* por meio da Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (CG-EM). A *G. graciliflora* e a *S. terebinthifolius* apresentaram potencial antifúngico frente a *C. albicans*, com valores da CIM 0,25 mg/mL e 1 mg/mL, respectivamente, e ausência de atividade antibacteriana (CIM > 2 mg/mL). As duas substâncias vegetais (1 mg/mL) reduziram o número de UFC/mL no biofilme de *C. albicans*. Na microscopia de fluorescência, observou-se manutenção da arquitetura celular da *C. albicans*. A *G. graciliflora* apresentou efeito citocida para todas as células das linhagens tumorais, exceto para a

K562 (leucemia); e o óleo essencial da *S. terebinthifolius* mostrou-se citocida para todas as linhagens. As substâncias vegetais não produziram hemólise acima de 50% até a concentração de 16 mg/mL. A análise fitoquímica do extrato da *G. graciliflora* revelou a predominância de compostos flavonoides, e no óleo essencial da *S. terebinthifolius*, de terpenos alfa e beta-felandreno. O extrato das folhas da *G. graciliflora* e o óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius* apresentaram potencial antifúngico frente a *C. albicans*, em sua forma planctônica e organizada em biofilme; atividade antiproliferativa frente às células de linhagens tumorais humanas e baixa toxicidade frente às hemácias. Podem representar promissoras fontes de compostos ativos, para o desenvolvimento de produtos ou medicamentos, com ação anticandida e/ou antiproliferativa. Desta forma, são necessários outros estudos, para ampliar os conhecimentos a respeito dessas espécies, seguindo para os estudos de riscos e eficiência do uso clínico dessas substâncias.

Palavras- Chaves: Produtos com ação antimicrobiana; Triagem de Medicamentos Antitumorais; *Guapira graciliflora* Mart; *Schinus terebinthifolius* Raddi.

ABSTRACT

Abstract

Medicinal plants represent a promising source of active compounds which can be used in the development of new drugs. There is a diversity of plants that are used by the population for therapeutic purposes, among which are the *Guapira graciliflora* Mart., popularly known as “joão-mole”, and *Schinus terebinthifolius* Raddi, known as “aroeira-da-praia”. These plants stand out in folk medicine due to its therapeutic properties in inflammatory and infectious processes. This study evaluated *in vitro* antimicrobial and antiproliferative activities besides, toxicity and chemical composition of the hydroalcoholic extract of the leaves of *G. graciliflora*. and the essential oil from unripe fruits of *S. terebinthifolius*. Antimicrobial activity was evaluated by microdilution technique in broth, with determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and bactericidal/ Fungicide minimum concentration (MBC / MFC) using to bacterial strains: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11775 and *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, and the yeast *Candida albicans* ATCC 10231. The extracts were analyzed against *C. albicans* biofilm after 48 hours of expositions, by means of the CFU / ml count and examination of cell morphology by fluorescence microscope (FM) using Calcofluor White. The antiproliferative activity was evaluated against nine tumor cell lines (U251, MCF7, NCI / ADR-RES, 786-0, NCI-460, HT29, K562, and PC-03 OVCAR-3) and a non-tumor cell line of keratinocytes (HaCat). Preliminar toxicity was evaluated through the hemolysis assay. Phytochemical analysis of the extract *G. graciliflora* was performed by thin-layer chromatography, and the essential oil of *S. terebinthifolius* was analysed by Gas Chromatography hifenized with Mass Spectrometry (GC-MS). The *G. graciliflora* and *S. terebinthifolius* samples showed potential antifungal against *C. albicans* with the MIC values of 0.25mg/mL and 1mg/mL, respectively, and no antibacterial activity (MIC>2mg/mL). Both samples (1mg/mL) reduced the number of CFU/mL of *C. albicans* biofilm. In fluorescence microscopy it was, observed the maintenance of cellular architecture of *C. albicans* after the treatments. The *G. graciliflora* extract presented cytocidal effect for all cells of the tumor lines except for the K562 (leukemia) while the essential oil of *S. terebinthifolius* proved cytocidal for all strains. Both samples did not produce hemolysis over 50% up to

a concentration of 16mg/mL. Phytochemical analysis of the extract *G. graciliflora* revealed the predominance of flavonoid compounds, and the major compound identified in *S. terebinthifolius* essential oil were to, terpene, alpha- and beta- phellandrene. The extract from the leaves of *G. graciliflora* and the essential oil of the fruit of *S. terebinthifolius* showed potential antifungal against *C. albicans* in their planktonic form and organized in biofilms; besides antiproliferative activity across the human tumor cell lines and low toxicity on red blood cells. They have been considered promising sources of active compounds, for product development and medicine, anticandida and antiproliferative action. This way, other studies may extend these results, aiming the development to the studies of herbal medicines to clinical use.

Keywords: Products with antimicrobial action; Selection trials Antitumor Drugs; *Guapira graciliflora* Mart; *Schinus terebinthifolius* Raddi.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras 1 -Visão geral de <i>Guapira graciliflora</i> Mart. (A) e das suas folhas (B).....	31
Figuras 2 -Visão geral de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (A) e dos seus frutos verdes(B).....	33
Figura 3 - Distribuição do número de unidades formadoras de colônias (UFC), contabilizadas no biofilme de 48 horas, após tratamento por 6 horas com as substâncias em teste. Valores representados em notação científica.....	51
Figura4 -Imagens representativas de <i>C. albicans</i> , provenientes do biofilme monoespécie de <i>C. albicans</i> de 48 horas, após tratamento por 6 horas com as substâncias em teste.....	51
Figura 5 -Proliferação de linhagens celulares em função da concentração do extrato da <i>Guapira graciliflora</i> Mart. (µg/mL).....	52
Figura 6 - Proliferação das linhagens celulares em função da concentração do óleo essencial da <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi(µg/mL).....	53
Figura 7 -Cromatofolhas utilizadas na Cromatografia de Camada Delgada (CCD), vista a olho nu (A), em comprimento de onda de 254 nm (B) e 366nm (C).....	56
Figura 8 – Cromatograma do óleo essencial da <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi.....	59

Figura 9 - Cromatograma expandido (5-27 min) do óleo essencial da *Schinus terebinthifolius* Raddi..... 76

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Valores das densidades de inoculação das linhagens celulares participantes do teste.....**47**
- Tabela 2** -Distribuição dos valores das concentrações inibitória mínima, bactericida e fungicida do extrato de *G.graciliflora* e óleo essencial da *S. terebinthifolius*, de acordo com o microrganismo.....**50**
- Tabela 3** -Valores de TGI (Total Growth Inhibition, concentração necessária para inibição de 100 % do crescimento celular) do extrato da *Guapira graciliflora* Mart. e do óleo essencial da *Schinus terebinthifolius* Raddi, sobre culturas de células tumorais humanas.....**54**
- Tabela 4** -Distribuição dos valores percentuais da hemólise produzida pelo extrato da *Guapira graciliflorae* pelo óleo essencial da *Schinus terebinthifolius*, de acordo com as concentrações.....**55**
- Tabela 5** - Analitos identificados no óleo essencial da *Schinus terebinthifolius* Raddi, por cromatografia gasosa acoplada a detector seletivo de massa.....**57**

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	26
1.1 <i>Guapira graciliflora</i> Mart.....	30
1.2 <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	31
2 OBJETIVOS	36
2.1 OBJETIVO GERAL	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3 METODOLOGIA	38
3.1 LOCAL DO ESTUDO	38
3.2 MATERIAL VEGETAL.....	38
3.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO	39
3.4 CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO	40
3.4.1 Microrganismos.....	40
3.4.2 Preparação do inóculo	40
3.4.2.1 Bactérias	40
3.4.2.2 Leveduras	41
3.4.3 Meios de cultura.....	41
3.4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima pelo método da Microdiluição	41
3.4.5 Leitura dos resultados da CIM.....	42
3.4.5.1 Bactérias	42
3.4.5.2 Leveduras	42
3.4.6 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)	43

3.5ATIVIDADE ANTIMICROBIANA SOBRE BIOFILME DE <i>Candida albicans</i>.	43
3.5.1 Superfície de Adesão de Biofilme.....	43
3.5.2 Formação da película de saliva na superfície dos discos	43
3.5.3 Preparo do inóculo	44
3.5.4 Formação do biofilme	44
3.5.5 Protocolo de tratamento das substâncias testes sobre o biofilme	44
3.5.6 Quantificação das células viáveis do biofilme residual	45
3.5.7 Análise morfológica do biofilme de <i>Candida albicans</i> por microscopia de Fluorescencia.....	45
3.6 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA EM CULTURA DE CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS	45
3.7 ENSAIO DE HEMÓLISE	46
3.8 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA	48
3.8.1 Óleo essencial da <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	48
3.8.2 Extrato hidroalcoólico da <i>Guapira graciliflora</i> Mart	48
4 RESULTADOS	50
5 DISCUSSÃO	60
6 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS.	71

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

As infecções constituem uma das principais causas de mortalidade no Brasil, cujo incremento tem sido observado com o passar dos anos (BRESOLIN, CECHINEL FILHO, 2010). O aumento das infecções pode estar associado a diversos fatores, como maior incidência de doenças imunossupressoras, que favorecem o seu desenvolvimento, especialmente, daquelas provocadas por agentes oportunistas, como a *Candida* spp; e ao aumento de microrganismos emergentes e daqueles resistentes aos agentes antimicrobianos. Esta situação tem gerado preocupação em nível da saúde pública e motivado a busca por novos fármacos, por meio de diferentes fontes de antimicrobianos, como bactérias, fungos, plantas e animais (BRESOLIN, CECHINEL FILHO, 2010).

A pesquisa de novas substâncias terapêuticas inicia-se com a pesquisa básica, seguida dos ensaios pré-clínicos e clínicos, até o registro do medicamento. A pesquisa básica inclui os primeiros ensaios em laboratório, detriagem, para identificação de propriedades biológicas, como atividades antimicrobiana, antiproliferativa e alguns aspectos de toxicidade. A atividade antimicrobiana geralmente é estudada por meio de ensaios *in vitro*, como o teste de susceptibilidade. Nestes testes comumente são selecionadas cepas padronizadas, representantes de diferentes tipos de microrganismos, como *Escherichia coli* para bactérias Gram-negativas, *Staphylococcus aureus* para Gram-positivas, e *Candida albicans* como representante de fungos leveduriformes. Em relação à avaliação toxicológica, alguns parâmetros podem ser inicialmente estudados através de testes *in vitro*, utilizando diferentes modelos celulares, como células de fibroblastos, queratinócitos humanos, eritrócitos, entre outros (BRESOLIN, CECHINEL FILHO, 2010). Também torna-se importante verificar a atividade antiproliferativa (anticâncer). Esta atividade é inicialmente verificada em ensaios *in vitro*, utilizando linhagens de células tumorais humanas (FOUCHE *et al.*, 2008; IWAMOTO *et al.*, 2015). 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, 65% foi originado de produtos naturais ou semi-sintéticos (NEWMAN, CRAGG, 2012).

Considerando o problema mundial da mortalidade causada pelas doenças infecciosas (OKEKE *et al.*, 2005), especialmente, daquelas desencadeadas por microrganismos oportunistas, como a *Candida* spp. (BRESOLIN, CECHINEL FILHO, 2010), o foco deste estudo foi primordialmente voltado para o estudo de duas plantas medicinais (*Guapira graciliflora* Mart.e *Schinus terebinthifolius* Raddi), com vistas à caracterização do seu potencial antimicrobiano frente à *Candida albicans*.

A *Candida* spp constitui um dos grupos de patógenos mais prevalentes de infecções fúngicas (GONÇALVES *et al.*, 2010; MOTTA *et al.*, 2010; SIFUENTES-OSOMIO *et al.*, 2012). Foram identificadas mais de 160 espécies de *Candida*, dentre essas, vinte são reconhecidas como patógenos humanos. As principais espécies patogênicas são *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii* e *Candida lusitanae*, sendo a *C. albicans* a mais comumente isolada (STRAMANDINOLI *et al.*, 2010; KRISHNAN, 2012; SARDI *et al.*, 2013; ESEBELAHIE *et al.*, 2013; RANARIO *et al.*, 2013).

As espécies de *Candida* são colonizadores das superfícies mucosas dos aparelhos digestório e genitourinário e da pele de seres humanos. Tornam-se agentes patogênicos em pessoas com o sistema imunológico comprometido, como por exemplo, pacientes com AIDS, pacientes oncológicos e diabéticos, causando infecções locais e, por vezes, sistêmicas, denominadas genericamente de candidose ou candidíase (STRAMANDINOLI *et al.*, 2010; KRISHNAN, 2012; SARDI *et al.*, 2013; ESEBELAHIE *et al.*, 2013; RANARIO *et al.*, 2013; ANSARI *et al.*, 2015; OLCZAK-KOWALCZYK *et al.*, 2015; OLISCOVICZ *et al.*, 2015).

Essas condições sistêmicas associadas ou não as condições locais, como inflamação causada pelo uso de prótese dentária removível mal adaptada e/ou mal higienizada, propiciam a proliferação local das espécies de *Candida*, resultando na formação de um biofilme, fundamental para instalação da infecção (ARNAUD *et al.*, 2012). O biofilme funciona como um nicho de proteção dos microrganismos aos antifúngicos. A formação do biofilme de *Candida* segue, basicamente, três fases distintas. Na fase inicial predomina a adesão das leveduras (blastósporos), numa superfície biótica ou abiótica, com formação das comunidades celulares (0-11 horas); na fase intermediária (12-30

horas), a produção de matriz de polissacarídeo; e na fase de maturação (38-72 horas), observa-se a presença de leveduras, pseudohifas e hifas envoltos numa densa matriz de polissacarídeo (CHANDRA *et al.*, 2001; PATHAK *et al.*, 2012).

Estudos multicêntricos realizados no Brasil e México verificaram que 4% das infecções da corrente sanguínea nosocomiais são causadas por espécies de *Candida*, sendo a espécie *C. albicans* a mais frequentemente isolada em humanos, principalmente da pele, orofaringe, trato respiratório inferior, trato gastrointestinal e sistema geniturinário (COLOMBO *et al.*, 2006; YAPAR, 2014).

Em pacientes hospitalizados, as espécies de *Candida* aparecem como o quarto microrganismo mais isolado em hemoculturas, sendo superado pelas bactérias *Staphylococcus* coagulase negativa, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* spp. (GUDLAUGSSON *et al.*, 2003; KEDZIERSKA *et al.*, 2003; WISPLINGHOFF *et al.*, 2004; WENZEL; SIFUENTES-OSOMIO *et al.*, 2012). Na cavidade oral de pacientes infectados pelo HIV, *C. albicans* e espécies de *Candida* não-*albicans* são, também, os microrganismos mais comumente isolados, correspondendo a um percentual de 51,56% e 43,73%, respectivamente (JUNQUEIRA *et al.*, 2012).

Observa-se um aumento do número de infecções na corrente sanguínea por espécies de *Candida* não *albicans* e o surgimento de espécies menos frequentes como: *Candida dubliniensis*, *Candida kefyr*, *Candida rugosa*, *Candida famata*, *Candida utilis*, *Candida lipolytica*, *Candida norvegensis*, *Candida inconspícua* (GIANNINI & MELHEM, 2000; PAPPAS *et al.*, 2003). Este dado é preocupante no âmbito da saúde pública, levando-se em consideração a resistência de cepas de *C. albicans* e de espécies emergentes de *Candida* não-*albicans*, a exemplo da *C. glabrata*, *C. krusei*, e *C. parapsilosis*, aos antifúngicos fluconazol e anfotericina B, frequentemente utilizados para tratar a candidose sistêmica (JUNQUEIRA *et al.*, 2012; ANAUL KABIR, ZULFIQAR AHMAD, 2013). No caso do tratamento da candidose oral, a nistatina é o medicamento de primeira escolha (PÁL *et al.*, 2013), no entanto, já existem relatos de resistência de algumas cepas de *C. albicans* a este fármaco (PÉREZ *et al.*, 2011).

Considerando que as infecções por *Candida* estão em ascensão, com consequências negativas na taxa de morbidade e mortalidade em pacientes

imunocomprometidos, discute-se a necessidade de múltiplas estratégias, com boa relação custo-benefício (ANAU KABIR, ZULFIQAR AHMAD, 2013). Neste contexto, inclui-se o desenvolvimento de novos medicamentos a partir de produtos naturais, especialmente, de plantas, por constituírem uma vasta fonte para a medicina, com forte potencial terapêutico (BRESOLIN, CECHINEL FILHO, 2010).

A utilização de plantas medicinais recebeu amparo legal significativo nos últimos anos (CARVALHO *et al.*, 2008) e o Ministério da saúde, através da Portaria nº971 de 03 de maio de 2006, aprovou a implantação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde, onde se insere a fitoterapia (BRASIL, 2006). Em torno de 70% dos agentes terapêuticos disponibilizados entre 1981 e 2006, para doenças infecciosas, bacterianas ou fúngicas, foram derivados de produtos naturais (NEWMAN, CRAGG, 2007). No entanto, em relação à prevenção ou tratamento da candidose os dados são ainda preliminares (FERREIRA *et al.*, 2015)

Estudos têm sido realizados para analisar o efeito de extratos, óleos essenciais e substâncias isoladas de plantas sobre espécies de *Candida*, na sua forma planctônica e organizada em biofilme (ROJAS *et al.*, 2001; DUARTE, 2006; ALVES *et al.*, 2012; ALVES *et al.*, 2013; CASTRO *et al.*, 2013; FREIRES *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2014; FREIRES *et al.*, 2015). Esses estudos constituem pesquisas básicas, essenciais na investigação de novos compostos ou substâncias para fins farmacológicos.

A busca por novos fármacos a partir de plantas, na maioria das vezes, é guiada pelos levantamentos etnofarmacológicos, que identificam as espécies mais comumente utilizadas pela população para fins medicinais. Alguns países da América Latina seguem programas de triagem de produtos naturais para atividade antimicrobiana, a exemplo do Brasil (SARTORATTO *et al.*, 2004; BRASILEIRO *et al.*, 2006; DESOTI *et al.*, 2011).

As plantas selecionadas para este estudo, *Guapira graciliflora* Mart. e *Schinus terebinthifolius* Raddi são utilizadas na medicina tradicional para diferentes fins terapêuticos, tais como cicatrizante e antimicrobiano (CORREIA *et al.*, 2006; AGRA *et al.*, 2008; PAIVA, ALOUFA, 2009; SIQUEIRA *et al.*, 2012; CHAVES *et al.*, 2013), cujas comprovações científicas ainda são incipientes, especialmente, na área da odontologia.

1.1 *Guapira graciliflora* Mart.

Guapira graciliflora (Mart. ex J.A. Schmidt) Lundell (sinonímia: *Pisonia graciliflora* Mart. ex J.A. Schmidt; *Torrubia graciliflora* Standl) pertence à família Nyctaginaceae, popularmente conhecida como João-mole, pau-mole, João-dormindo, Maria-mole (Figura 1) (LORENZI, 2008).

A família Nyctaginaceae possui cerca de 400 espécies distribuídas em 30 gêneros (RODMAN *et al.*, 1984). Possui ocorrência pantropical (SOUZA, LORENZI, 2005), com poucas espécies ocorrendo em clima temperado (CRONQUIST, 1981; RODMAN *et al.*, 1984). No Brasil, ocorrem cerca de 10 gêneros e 70 espécies (SOUZA, LORENZI, 2005).

G. graciliflora pode ser encontrada como árvore, arvoreta ou até arbusto de 0,3 a 8,0 metros de altura, com folhas apresentando grande variabilidade morfológica. Em geral, são de formato oblongo a elíptico, de base e ápice agudos. Os frutos são em forma de drupa elipsóide, de cor vermelho-vinácea. A madeira é leve, muito flexível, pouco resistente e sujeita ao rápido apodrecimento quando exposta; e não apresenta exsudação ao destacar suas folhas (SILVA JUNIOR, 2005).

G. graciliflora aparece na caatinga, principal bioma do semiárido brasileiro, como uma fonte de recursos vitais para a sobrevivência da população local (CHAVES *et al.*, 2013) sendo também utilizado como planta medicinal (AGRA *et al.*, 2008) para o tratamento de tuberculose, como anti-inflamatório e cicatrizante (AGRA *et al.*, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2012).

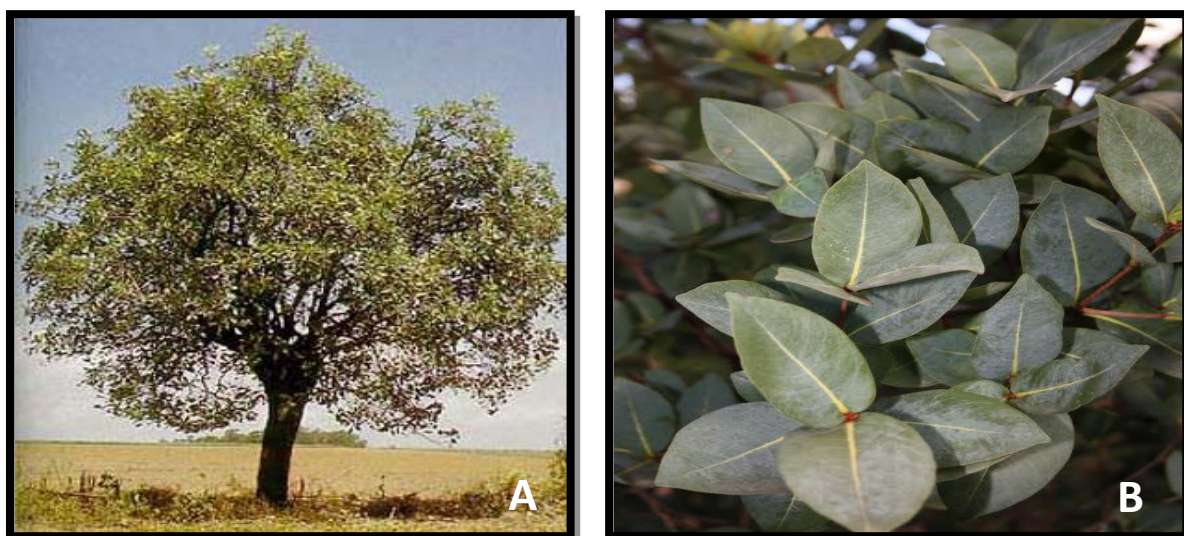
Poucos estudos foram desenvolvidos para investigar as propriedades biológicas ou farmacológicas de *G. graciliflora*. Costa *et al.* (2010) avaliaram o potencial antimicrobiano do extrato hidroalcoólico das suas folhas e constatou atividade contra a *Klebsiella pneumoniae*. Em estudo similar, Rocha *et al.* (2013) observaram atividade do extrato das folhas frente a *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. O uso de *G. graciliflora* na medicina popular associado a esses resultados preliminares sinalizam um possível potencial antimicrobiano desta planta e motivaram a sua inserção neste estudo.

As propriedades farmacológicas das plantas são atribuídas à ação de seus metabólitos secundários (COSTA *et al.*, 2010). Foi verificado que o extrato

da casca de *G. graciliflora* possui flavonóides (CHAVES *et al.* 2013), os quais podem ser responsáveis por propriedades antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória e antioxidante das plantas (LONGHINI *et al.*, 2007).

Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas podem variar por diversos fatores, como variação sazonal, solo cultivado, tipos de insetos presentes em cada região, interferindo diretamente em suas propriedades biológicas (GOBBO-NETO, LOPES, 2007; FUMAGALI *et al.*, 2008; NCUBE *et al.*, 2010). Foi observado por Chaves *et al.* (2013) que a concentração de flavonóides nas cascas de *G. graciliflora* foi mais alta no período chuvoso do que no período de seca.

Figura 1: Visão geral de *Guapira graciliflora* Mart. (A) e das suas folhas (B).



1.2 *Schinus terebinthifolius* Raddi

Schinus terebinthifolius Raddi trata-se de uma árvore mediana de 5 a 10 metros de altura (Figura 2) (LORENZI, MATOS, 2008). Pertence a Família Anacardiaceae (CORREIA *et al.*, 2006). O gênero *Schinus* é nativa da América do Sul, largamente encontrado na costa brasileira, com distribuição do nordeste ao sul do país (BARBOSA *et al.*, 2007) e abrangência de cerca de 29 espécies (BARKLEY, 1957).

S. terebinthifolius também é conhecido como *pepper tree* brasileira, falsopimenta ou poivrier falso, aroeira-da-praia, aroeira negra, aroeira vermelha, aroeira de minas, cor-neiba, chichita, copal, pimenta rosa e pimenta de Brasil (MORTON, 1978). As aplicações biológicas desta planta têm sido

conhecidas por muitos anos, cujas propriedades foram descritas desde a primeira edição da Farmacopéia Brasileira, publicado em 1926. *S. terebinthifolius* é utilizada na medicina tradicional como agente, antipirético, depurativo, diurético, analgésico, no tratamento de doenças sexualmente transmissíveis, inflamações uterinas, infecções do trato urinário e úlceras de pele (CORREIA *et al.*, 2006; PAIVA, ALOUFA, 2009;).

Praticamente, todas as partes da planta (casca, folhas e frutos) são utilizadas pela população para preparo das substâncias medicinais (BORNHAUSEN, 2002), podendo gerar cinco subtipos de preparos: extrato da entrecasca do caule, extrato das folhas, óleo essencial das folhas, extrato do fruto e o óleo essencial do fruto (GILBERT, FAVORETO, 2011).

S. terebinthifolius apresenta frutos do tipo drupa, globóides, aromáticos, com coloração inicialmente verde, mudando para vermelho quando maduros (DEGÁSPARI *et al.*, 2005). Os frutos, tanto verdes quanto maduros, são ricos em óleo essencial (STAHL *et al.*, 1983) com rendimento de 5,50 a 8,41%. Em sua composição química há predominância de monoterpenos (85,10%), sendo os mais abundantes δ -3-careno (30,37%), limoneno (17,44%), α -felandreno (12,60%), α -pineno (12,59%), mirceno (5,82%) e o-cimeno (3,46%), seguido pelos sesquiterpenos (5,34%) *trans*-cariofileno, Y-muuruleno, *E*, *E*- α -farneseno, δ -cadineno e epi- α -cadinol (MATSUO *et al.*, 2011).

As propriedades bioativas de *S. terebinthifolius* têm sido investigadas em vários estudos (BARBOSA *et al.*, 2007; BORBA *et al.*, 2007; DESOTI *et al.*, 2011; MATSUO *et al.*, 2011; CHAVES *et al.*, 2013). Foi demonstrado que o óleo essencial de seus frutos acelera a cicatrização de lesões cutâneas (ESTEVÃO *et al.*, 2013) e gástricas (SANTOS *et al.*, 2012). Verificou-se em modelo animal que o padrão do α -pineno, monoterpenos encontrados nos frutos da *S. terebinthifolius* induz apoptose e diminui a ocorrência de metástase pulmonar de melanoma (MATSUO *et al.*, 2011).

Em relação ao seu potencial antimicrobiano, alguns estudos foram encontrados na literatura (SANTOS *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2012; FREIRES *et al.*, 2013; COLE *et al.*, 2014). Foi constatado que a tintura das folhas de *S. terebinthifolius* possui atividade antifúngica contra *Candida tropicalis*, inibindo, provavelmente, a formação da parede celular fúngica (ALVES *et al.*, 2012; ALVES *et al.*, 2013).

Santos *et al.* (2010) comprovaram atividade antifúngica do óleo essencial das folhas da *S. terebinthifolius*, frente a leveduras do gênero *Botrytis* spp. Foi observado, também, que o óleo essencial de suas folhas possui atividade antibacteriana contra espécies de *Estafilococos*, isoladas de otite de cães (SILVA *et al.*, 2010).

Suas propriedades biológicas são estudadas no âmbito da Odontologia, cujas observações apoiam o uso tradicional desta planta em problemas ou doenças da cavidade oral. Os estudos relatam efeito positivo do extrato das folhas de *S. terebinthifolius* na cicatrização pós exodontia em ratos. Também há relatos de processo de reparo do tecido epitelial, reparo do tecido conjuntivo e estímulo da maturação do colágeno (SANTOS *et al.*, 2006; LANZONI, 2007). Em relação aos patógenos orais, foram avaliadas as propriedades biológicas do extrato das folhas de *S. terebinthifolius* contra a *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, cujos resultados apontaram esta planta como uma opção terapêutica para infecções da cavidade oral, como a estomatite protética, cárie dentária e periodontite (PEREIRA *et al.*, 2011). Em estudo clínico randomizado foi verificado que bochechos com a tintura produzida do caule de *S. terebinthifolius* (0,3125%) reduz a inflamação gengival induzida por biofilme (FREIRES *et al.*, 2013).

Figura 2: Visão geral de *Schinus terebinthifolius* Raddi (A) e dos seus frutos verdes (B).



Face à importância da candidose como problema de saúde pública, associada ao surgimento de resistência de algumas cepas aos antifúngicos disponíveis, a busca de novas substâncias capazes de neutralizar ou de danificar o patógeno-alvo, ao invés de inviabilizá-lo geneticamente, torna-se uma importante estratégia para o tratamento dessa infecção. Nesta perspectiva, introduzimos no estudo as plantas *Guapira graciliflora* Mart.e a *Schinus terebinthifolius* Raddi, como promissoras fontes de compostos ativos.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

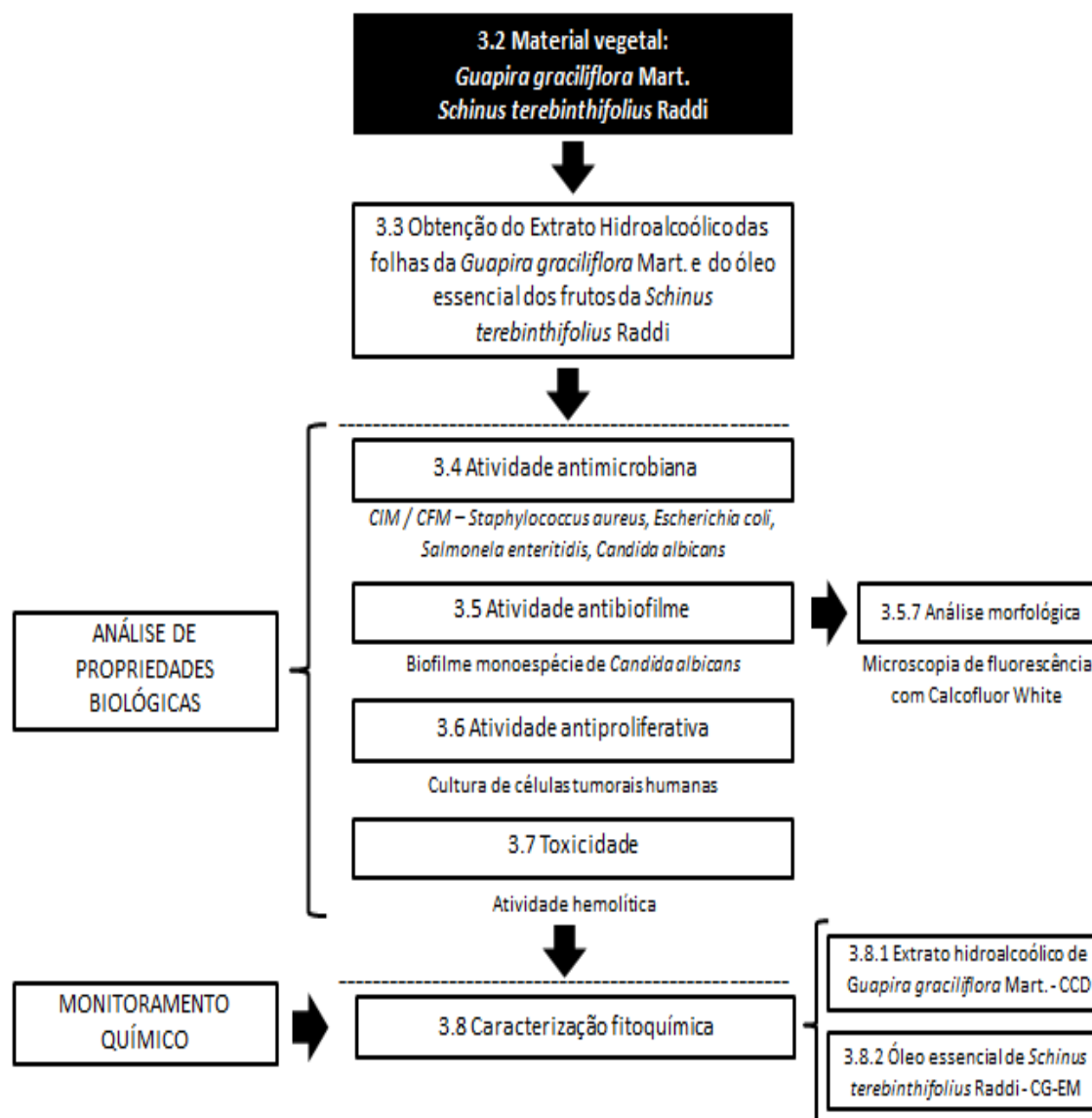
Avaliar *in vitro* as atividades antimicrobiana, antiproliferativa e hemolítica do extrato hidroalcoólico das folhas de *Guapira graciliflora* Mart. e do óleo essencial dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o extrato hidroalcoólico das folhas de *Guapira graciliflora* Mart. e do óleo essencial dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi.
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) das amostras em teste;
- Determinar a atividade antibiofilme das amostras sobre biofilme monoespécie de *Candida albicans*;
- Analisar a morfologia da *C. albicans* tratada com as amostras;
- Verificar a atividade antiproliferativa sobre linhagens de células tumorais humanas das amostras em teste;
- Avaliar a atividade hemolítica do extrato de *G. graciliflorae* do óleo essencial de *S. terebinthifolius* frente às hemácias;
- Identificar os constituintes químicos presentes nas amostras em teste.

METODOLOGIA

3 METODOLOGIA



3.1 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado no laboratório de Desenvolvimento e Ensaio em Medicamentos (LABDEM), do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – PB e no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) em Campinas – SP.

3.2 MATERIAL VEGETAL

As folhas da *Guapira Graciliflora* Mart. foram coletadas na região do semiárido paraibano, no município de Queimadas, na mesoregião da

Borborema e microregião do Cariri Oriental, no mês de agosto de 2013. O material foi limpo, acondicionado em sacos de papel e secos em estufa de ar circulante (FANEM®, modelo 330) a temperatura de 40°C até a obtenção do peso constante. O material desidratado foi armazenado em saco de papel, em temperatura ambiente, até o momento da obtenção do extrato. O espécime testemunho de *Guapira graciliflora* Mart. foi depositado na coleção do Herbário Manuel de Arruda Câmara (ACAM), da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus I, Campina Grande, Paraíba, sob o registro nº 907/ACAM.

Os frutos verdes de *Schinus terebinthifolius* Raddi foram coletados no mês de agosto, na região do semiárido paraibano no município de Campina Grande, na área do Campus I da Universidade Estadual da Paraíba (7°12' 35" S, 35° 54' 57"W). Os frutos foram armazenados em geladeira, até o momento da obtenção do seu óleo essencial. O espécime testemunho de *Schinus terebinthifolius* Raddi, foi depositado na coleção do Herbário Manuel de Arruda Câmara (ACAM), da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus I, Campina Grande, Paraíba, sob o registro nº 486/ACAM.

3.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO E DO ÓLEO ESSENCIAL

O extrato hidroalcoólico das folhas de *G. Graciliflora* foi obtido através do processo de maceração, por cinco dias, em temperatura ambiente e protegido da luz, utilizando a proporção de 200g de planta seca moída para 1 litro do solvente (Álcool Etílico 50%). O extrato armazenado em percolador foi então coletado. Após obtenção do extrato, o álcool foi removido em evaporador rotativo (Quimis® / Q344 M) a 40° C, com bomba à vácuo e o extrato remanescente liofilizado (Labconco® / Freezone 4.5).

Para a obtenção do óleo essencial dos frutos verdes de *S. terebinthifolius* foi realizada hidrodestilação em sistema do tipo Clevenger, Utilizou-se 50g da planta e 200 mL de água destilada procedendo-se à destilação por 2 horas. O óleo essencial foi acondicionado em frasco de vidro hermeticamente fechado, envolto em papel alumínio e armazenados a -22°C até o momento do uso.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO

O potencial antimicrobiano do extrato hidroalcoólico da *G. graciliflora* e do óleo essencial da *S. terebinthifolius* foi caracterizado por meio de ensaios *in vitro*, utilizando a técnica da microdiluição em caldo e análises em biofilme monoespécie.

3.4.1 Microrganismos

Na triagem antimicrobiana, foram utilizadas cepas padronizadas de bactérias (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076) e de levedura (*Candida albicans* ATCC 10231).

3.4.2 Preparo do inóculo

3.4.2.1 Bactérias

O preparo dos inóculos bacterianos para os testes de suscetibilidade microbiana 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 24 horas e adicionadas em solução salina estéril (5 mL), ajustando-se sua absorbância entre 0,08 a 0,10 a 625 nm, para obtenção de uma densidade equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. A partir desta suspensão, foram realizadas diluições seriadas obtendo-se, ao final, uma densidade de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL. Um mililitro desta suspensão foi adicionado em 500 µL de meio de cultura específico, obtendo-se uma densidade de 1×10^6 UFC/mL. Nos poços da microplaca, para determinação da concentração inibitória mínima pela técnica da microdiluição em caldo, a suspensão resultou na densidade final de 5×10^5 UFC/mL.

3.4.2.2 Leveduras

O preparo do inóculo das leveduras 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, para obtenção de uma densidade equivalente a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL. A partir disso, foram realizadas diluições seriadas, obtendo-se, ao final da mesma, uma densidade de $5,0 \times 10^5$ UFC/mL. Um mililitro desta suspensão foi adicionado em 9 mL de meio de cultura RPMI-1640, homogeneizados e novamente adicionados em 9 mL do meio de cultura, estabelecendo-se uma densidade de 5×10^3 UFC/mL. Nos poços da microplaca, a suspensão final resultou em uma densidade de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

3.4.3 Meios de cultura

Para manutenção das bactérias foi utilizado o Brain Heart Infusion Agar (BHI Ágar) e para leveduras o ágar sabouraud dextrose.

Para os testes de atividade antimicrobiana pelo método da microdiluição em caldo, foram utilizados os meios RPMI – 1640 (Angus Buffers & Biochemicals, Niagara Falls, NY, USA) para *C. albicans* e Müller-Hinton para bactérias.

Nos ensaios com biofilme monoespécie de *C. albicans* foi utilizado o Sabouraud dextrose caldo.

3.4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima pelo método da microdiluição

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das amostras em teste foi realizada através da técnica da microdiluição em caldo, proposta pelo CLSI (2010), utilizando microplacas esterilizada para microdiluição, contendo 96 poços (8 linhas A-H/ 12 coluna). Foram depositados 100 µL do meio de cultura específico para bactérias e leveduras. Em seguida, acrescentou-se 100 µL/poço das soluções em teste na concentração inicial de 4mg/mL, e procedeu-se a microdiluição, ou seja 100 µL do conteúdo do

primeiro poço foi homogeneizado e transferido para o seguinte, repetindo-se este procedimento até o último poço (linha H), com obtenção das concentrações entre 7,81 e 1000 µg/mL da amostra em teste. Os 100 µL finais foram desprezados. Posteriormente, 100µL do inóculo do microrganismo de 24 horas foram adicionados. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera aeróbia ou microaerofilia, de acordo com a exigência do microrganismo (CLSI 2008, 2009).

Foram incluídos nos testes cloranfenicol 500µg/mL (Sigma-Aldrich®) e a nistatina 500µg/mL(Sigma-Aldrich®) como controles positivos. Para verificar a esterilidade do meio de cultura e controle do crescimento do microrganismo, bem como, dos materiais vegetais testados, os mesmos foram colocados de forma individualizada nas microplacas. Os ensaios foram realizados em triplicata em três experimentos independentes.

3.4.5 Leitura dos Resultados da CIM

3.4.5.1 Bactérias

Após o período de incubação, foram adicionados 50 µL/poço do revelador cloreto de trifetil tetrozolium e as placas foram incubadas novamente por 3 horas. Este corante é capaz de distinguir as amostras que possuem microrganismos viáveis com atividade respiratória, através da mudança de coloração. Quando existe respiração celular o meio fica rosa-avermelhado, e quando não há a identificação de respiração celular, é transparente.

3.4.5.2 Leveduras

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).

Para classificação da atividade antimicrobiana foram considerados os parâmetros estabelecidos por Aligiannis *et al.* (2001) que classificam: forte inibição - CIM até 500 µg/mL; inibição moderada - CIM entre 600 e 1500 µg/mL e como fraca inibição - CIM acima de 1600 µg/mL.

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

Para determinar a atividade bactericida ou fungicida, uma alíquota de 50 µL de cada poço, com concentrações igual e 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 (CLSI 2005, 2008).

3.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA SOBRE BIOFILME DE *Candida albicans*

3.5.1 Superfície de adesão do biofilme

Para formação do biofilme foram utilizados discos (2mm de altura x 10 mm de diâmetro) de resina acrílica incolor quimicamente polimerizada (3M™ Quest QC-20, Sumaré- SP, Brasil). Os discos foram preparados de acordo com as instruções do fabricante (100°C, em proporções iguais de pó e líquido, sem incorporação de bolhas de ar, durante 20 minutos) e em seguida foram imersos em água purificada a uma temperatura de 37°C, por 24 horas, para liberação de monômero residual. Os discos foram polidos, desinfetados em álcool etílico 70% e água ultrapurificada, com o auxílio de um equipamento de ultrassom, durante 20 minutos, e armazenados em tubo de vidro com água destilada (FREITAS-FERNANDES *et al.*, 2014).

3.5.2 Formação da película de saliva na superfície dos discos

Os discos de resina foram envolvidos em saliva humana para formação da película de saliva. Uma amostra de 50 mL de saliva foi coletada no dia de cada experimento, através da estimulação mastigatória com filme flexível (Parafilm M; American Can Co, Neenah, WI). Em seguida, a saliva foi clarificada por centrifugação, utilizando 5.200 rpm (rotações por minuto), por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e esterilizado por meio de filtros (Exon Biotec®) de 0.22 µm de porosidade, para uso imediato. Para a formação da película de saliva, os discos foram distribuídos, sem sobreposição, em placa de

petri, cobertos com a saliva e incubados por 1 hora e 30 minutos, sob temperatura de 37°C (FREITAS-FERNANDES *et al.*, 2014).

3.5.3 Preparo de inóculo

Uma cultura de *C. albicans* foi reativada e incubada por 24 horas a 37°C. Em seguida, as células foram colhidas e suspensas em Sabouraud Dextrose Caldo. A densidade celular foi padronizada por espectrofotometria normalizada, para uma densidade óptica de 0,08 a 0,1, sob comprimento de onda de 490nm, correspondendo a um inóculo de 1×10^7 UFC/mL.

3.5.4 Formação do biofilme

Após o período de formação da película de saliva, os discos de resina foram transferidos para um recipiente estéril contendo 10% da suspensão do inóculo de *C. albicans* (1×10^7 UFC/mL) em meio de cultura. Foi conduzida uma adesão inicial por 4 horas a 37°C. Posteriormente, os discos foram lavados em solução salina (NaCl/0.9%) para remoção das células não aderidas e imersos em novo meio de cultura (Sabouraud Dextrose Caldo) sem adição do inóculo. O biofilme foi desenvolvido por 48 horas, incluindo uma troca do meio de cultura com 24 horas. O teste foi realizado em quadruplicata.

3.5.5 Protocolo de tratamento com as amostras testes sobre o biofilme

As amostras foram testadas na concentração de 1 mg/mL. Após a formação do biofilme por 48 horas, os discos de resina foram levemente lavados em solução salina e imersos em novo recipiente estéril, distribuídos em quatro grupos, de acordo com o tratamento: 1) controle de crescimento, sem adição de substância antimicrobiana, 2) nistatina 1000µg/mL, 3) óleo essencial da *S. terebinthifolius* 1000µg/mL, e 4) extrato da *G. graciliflora* 1000µg/mL. O óleo essencial foi diluído em DMSO 10%, e o extrato hidroalcoólico no próprio meio de cultura. Os discos permaneceram imersos nas amostras por um período de 6 horas. Após o tratamento, os discos foram removidos, lavados com solução salina para remoção das células de *C. albicans* não aderidas e

colocados em tubos contendo 2 mL de solução salina para quantificação das células viáveis.

3.5.6 Quantificação das células viáveis do biofilme residual

Os discos imersos nos tubos contendo 2 mL de solução salina foram sonificados, sob 7W por 30 segundos, para remoção das células de *C. albicans* aderidas. A solução sonificada foi diluída (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}) e uma alíquota de 20µL de cada diluição foi plaqueada em triplicata, em meio ágar sabouraud dextrose (Difco®). Os recipientes foram incubadas a 37°C por 48 horas. As unidades formadoras de colônia (UFC) foram quantificadas, isto é, contadas e os resultados expressos em UFC/mL (FREITAS-FERNANDES *et al.*, 2014).

3.5.7 Análise morfológica da *Candida albicans*, por microscopia de fluorescência

Células de *C. albicans*, provenientes do biofilme, foram suspensas em solução salina e coradas com calcofluor White para identificação da presença de quitina na parede celular do microrganismo. Uma alíquota de 20µL da solução fúngica (10^6 mL^{-1}) foi misturada com 20µL de solução (1 mg mL^{-1}) de calcofluor White (Sigma-Aldrich®), inseridas em uma lâmina de vidro e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente (Laffey & Butler, 2005). Posteriormente, as células foram visualizadas sob campo brilhante e UV, usando microscópio de fluorescência Observer Z1 (Zeiss, Germany).

3.6 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA EM CULTURA DE CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS

As linhagens utilizadas no estudo foram cedidas pelo NCI (National Cancer Institute, EUA). Todas as linhagens foram cultivadas em frascos de 25mL (T25) com 5mL de meio RPMI 1640, suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Inicialmente, a

amostra foi diluída em dimetilsulfoxido de sódio (DMSO) na proporção de 500 µL de DMSO para cada 5 mg da amostra.

Em placas contendo 96 poços, foram adicionadas as células em meio RPMI/Soro Fetal Bovino (SFB) acrescido de 1mL/L de penicilina:estreptomicina (1000 U/mL: 1000 µg/mL), nas suas respectivas densidades de inoculação (Tabela 1). Em seguida, as placas foram incubadas por 24 horas a 37°C em ambiente úmido, acrescido de 5% de CO₂. Foi fixada então a placa controle (T0) através da adição de 50µL/compartimento de ácido tricloroacético a 50% para determinação da quantidade de proteínas no momento da adição das amostras. As amostras foram adicionadas, em triplicata, nas demais placas nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL (100 µL/compartimento). As placas foram então incubadas por mais 48 horas. O quimioterápico doxorrubicina foi utilizado como controle positivo nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5e 25 µg/mL (100 µL/compartimento), em triplicata. Após o tempo de exposição, as células foram fixadas com 50µL/compartimento de ácido tricloroacético a 50% (TCA), e após 1 hora a 4°C, as placas foram submetidas a quatrolavagens consecutivas com água corrente, para a remoção dos resíduos de TCA, meio,SFB e metabolitos secundários. Esperou-se a secagem completa das placas, expostas a temperatura ambiente.

Na sequência foram adicionados 50 µL/compartimento do corante proteico sulforrodamina B (SRB) a 0,4% dissolvido em ácido acético a 1%, e aguardados 30 minutos, para que as células ficassem coradas. Logo após as placas foram lavadas, por quatro vezes consecutivas, com solução de ácido acético 1%. Foi aguardada a secagem das placas em temperatura ambiente. O corante ligado as proteínas celulares foi solubilizado com solução de Trizma Base (10µM, pH 10,5). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em leitor de microplacas em 540 nm (SACOMAN *et al.*, 2008).

Tabela 1: Valores das densidades de inoculação das linhagens celulares participantes do teste.

	Densidade de Inoculação
U251/ Glioma	3×10^4
MCF7/ Mama	6×10^4
NCI/ADR-RES/ Ovário Resistente	5×10^4
786-0/ Rim	3×10^4
NCI-H460/ Pulmão	4×10^4
PC-03/ Próstata	$4,5 \times 10^4$
OVCAR-3/ Ovário	7×10^4
HT29/ Cólon	5×10^4
K-562/ Leucemia	6×10^4
hAcAT/Queratinócitos	3×10^4

3.7 ENSAIO DE HEMÓLISE

Preparou-se uma suspensão de hemácias 5% em solução salina NaCl/ 0,9%. Em seguida, 2 mL desta suspensão foi distribuída em tubos de ensaio e homogeneizadas com 2 mL de cada amostra teste em diferentes diluições (16, 08, 04, 02 e 1 mg/mL). Após 1 hora, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm, durante 10 minutos, e realizada a leitura visual, para quantificação das hemácias que sofreram lise. A visualização da hemólise foi classificada como: (–): 0% de hemólise, (+): 25% de hemólise, (++) : 50% de hemólise, (+++) : 75% de hemólise e (++++): 100% de hemólise (Luize *et al.*, 2005). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu® UV mini – 1240), no comprimento de onda de 540nm, utilizando como branco a solução salina. O controle negativo foi a suspensão de hemácias 5% com solução salina e como controle positivo foi usado Líquido de Turk (Ácido Acético 2%), acrescido de duas gotas de azul de metileno, o qual provoca 100% de hemólise.

3.8 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA

3.8.1 Extrato hidroalcoólico das folhas de *Guapira graciliflora* Mart.

Os compostos químicos do extrato da *G. graciliflora* foram identificados por Cromatografia de Camada Delgada (CCD), utilizando-se cromatofolhas de alumínio com fase estacionária de sílica (cromatofolha–alumínio CCF-C/25, Merck). Como fase móvel foi utilizada a mistura de acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético e água, nas proporções de 100:11:11:26, respectivamente. Os componentes químicos da amostra foram visualizados sob luz ultra-violeta (254nm) e a cromatofolha revelada com NP/PEG/macrogol para evidenciar flavonóides com posterior aquecimento a 50°C durante 5 minutos para a secagem da cromatofolha.

3.8.2 Óleo essencial da *Schinus terebinthifolius* Raddi

Análise fitoquímica do óleo essencial da *S. terebinthifolius* foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM). Alíquotas de 400 µL (micropipeta Eppendorf, Research plus, 100-1000 µL) do óleo foram colocados dentro de "vials" de vidro. A amostra foi analisada em um cromatógrafo a gás (QP 2010 Plus, Shimadzu Co.) acoplado a um espectrômetro de massa, equipado com uma coluna capilar DB-5 (J&W Scientific, Palo Alto, CA) 30m x 0,25µm x 02,5µm e um detector operando no modo "scanning" (m/z 40-400). A programação de temperatura foi de 60° C (0,3 minutos), com um incremento de 3°C/min até 240° C (15 minutos). A amostra (0,5 µL) foi injetada por um auto-injetor, utilizando a técnica de injeção "splitless". A integração foi feita através do software específico do equipamento. Terpenos e sesquiterpenos foram identificados por comparação com os dados obtidos do CG-EM (co-injeção com n-alcanos) de padrões autênticos metilados e eluídos nas mesmas condições. Os compostos químicos foram identificados por comparação com os dados do espectro de massas da biblioteca do equipamento (Nist- 11).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

O extrato de *G. graciliflora* e o óleo essencial de *S. terebinthifolius* apresentaram, respectivamente, forte e moderado potencial antifúngico frente a *C. albicans* e nenhuma atividade frente às bactérias, até a concentração de 1mg/mL (Tabela 1).

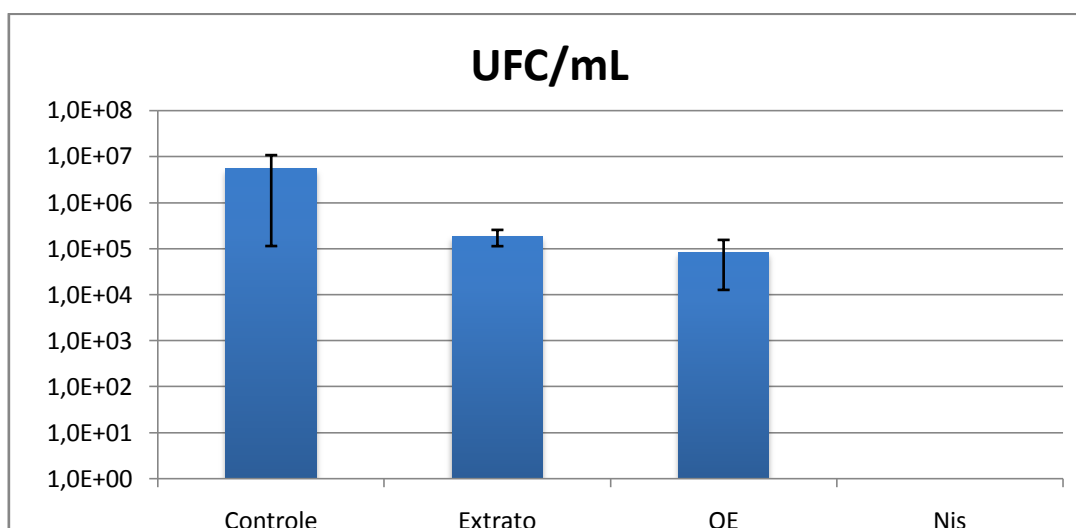
Tabela 2: Distribuição dos valores das concentrações inibitória mínima, bactericida e fungicida do extrato de *G. graciliflora* e óleo essencial da *S. terebinthifolius*, de acordo com o microrganismo.

MICROORGANISMO	<i>G. graciliflora</i>	<i>S. terebinthifolius</i>	<i>G. graciliflora</i>	<i>S. terebinthifolius</i>	Controles	
	CIM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CBM/CFM (µg/mL)	CBM/CFM (µg/mL)	Nistatina CIM (µg/mL)	Cloranfenicol CIM (µg/mL)
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	□1000	□1000	–	–	–	8
<i>E. coli</i> ATCC 11775	□1000	□1000	–	–	–	8
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	□1000	□1000	–	–	–	125
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	250	1000	1000	1000	2	–

Legenda: CIM; CBM; CFM; Faixa de concentração das amostras e dos controles.

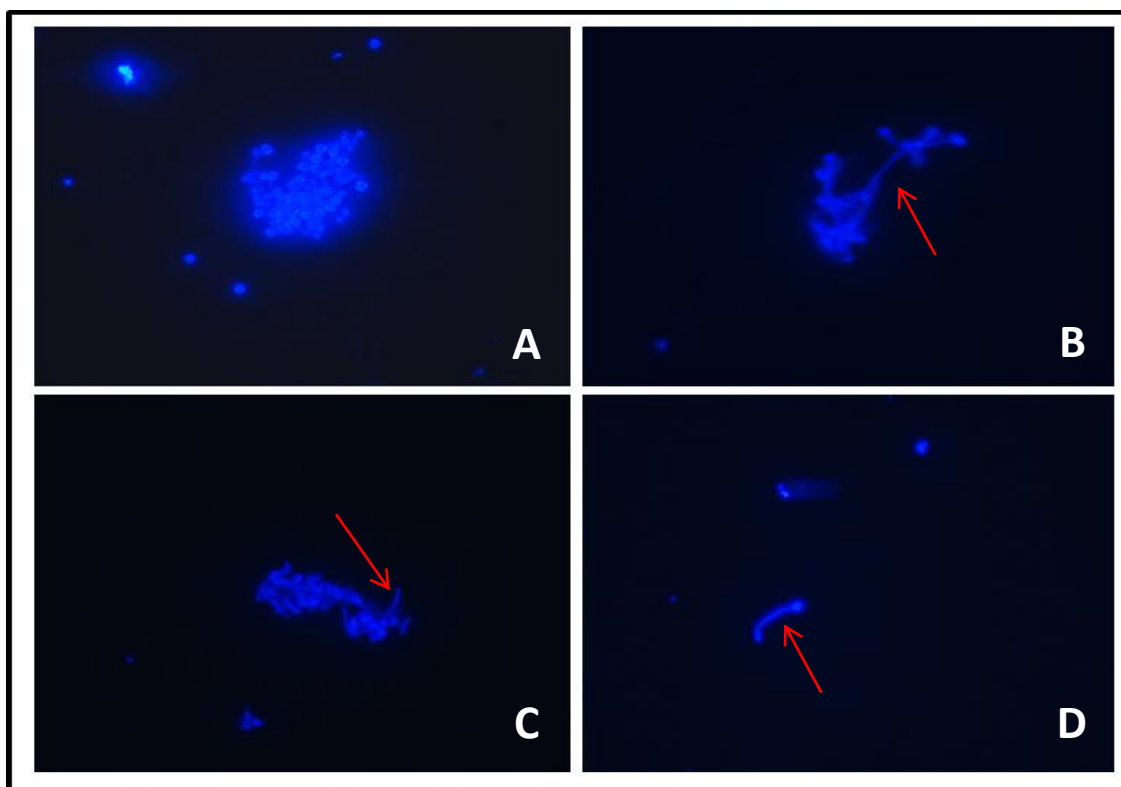
Em relação à atividade antibiofilme do extrato de *G. graciliflora* e do óleo essencial de *S. terebinthifolius* sobre biofilme monoespécie de *C. albicans*, ambas amostras reduziram o número de células (UFC/mL) no biofilme de 48 horas. O extrato de *G. graciliflora* e o óleo essencial da *S. terebinthifolius* apresentaram redução de células viáveis em 96,63% e 98,47%, respectivamente, quando comparados com o grupo do controle de crescimento (Figura 3). A nistatina na concentração de 1 mg/mL inibiu 100% o crescimento de unidades formadoras de colônia de *C. albicans*, provenientes do biofilme de 48 horas, tratado por 6 horas com o antifúngico. A microscopia de fluorescência não revelou alteração no arcabouço da *C. albicans* independente do tratamento (Figura 4).

Figura 3- Distribuição do número de unidades formadoras de colônias (UFC), contabilizadas no biofilme de 48 horas, após tratamento por 6 horas com as substâncias em teste. Valores representados em notação científica



Legenda: Controle (sem adição de antifúngico), Extrato 1mg/mL (*G. graciliflora*); OE 1mg/mL (*S. terebinthifolius*), Nis 1mg/mL (Nistatina)

Figura 4 - Imagens representativas de *C. albicans*, provenientes do biofilme monoespécie de *C. albicans* de 48 horas, após tratamento por 6 horas com as substâncias em teste.

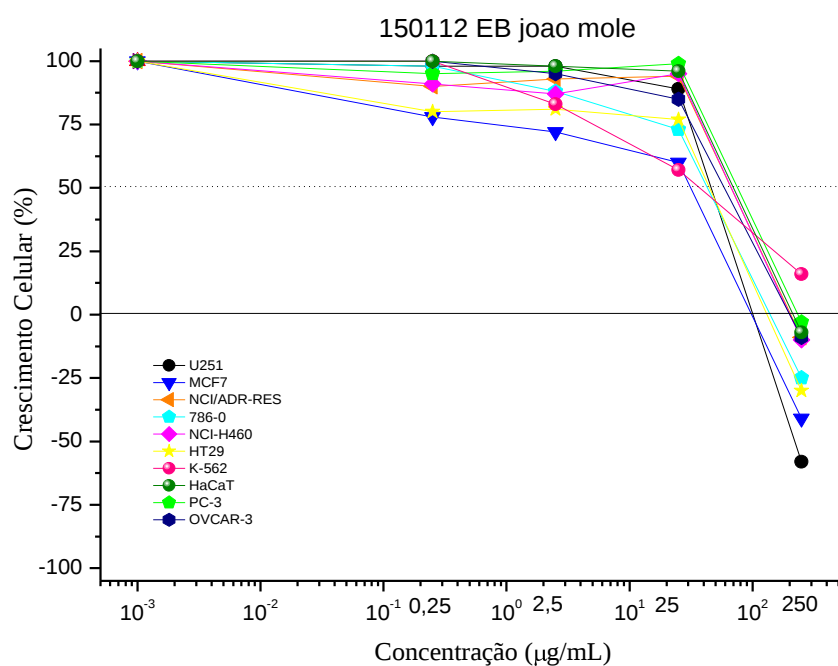


graciliflora e (D) tratado com o óleo essencial da *S. terebinthifolius*. A *C.albicans* foi corada

com calcofluor White. Visualiza-se manutenção do arcabouço celular, com presença de hifas (setas vermelhas) nos três grupos tratados (B; C; e D).

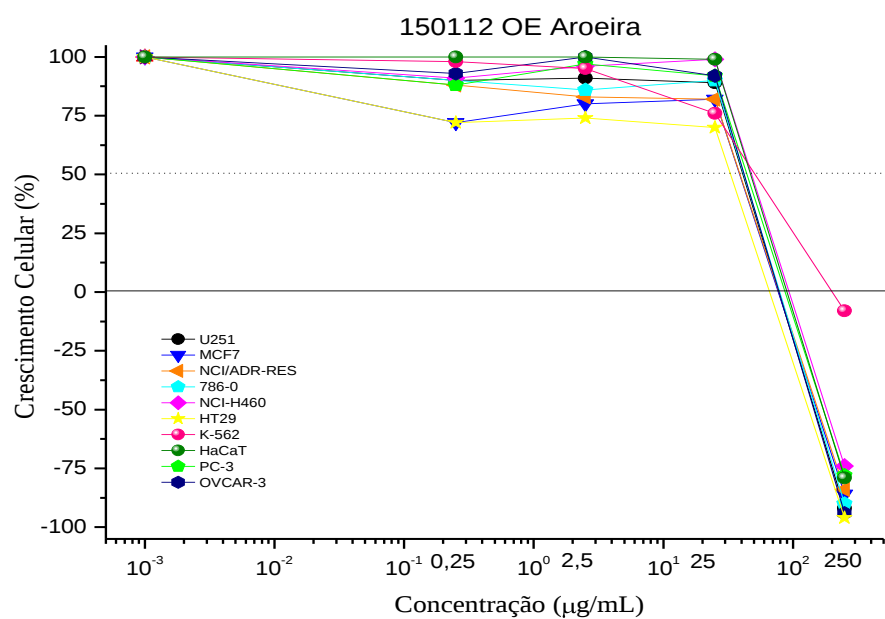
No teste de atividade antiproliferativa, o extrato da *G. graciliflora* e o óleo da *S. terebinthifolius* apresentaram efeito citocida na maior concentração avaliada (250 $\mu\text{g/mL}$) para as células tumorais das linhagens testadas (Figuras 5 e 6, Tabela 3).

Figura 5 – Proliferação de linhagens celulares em função da concentração do extrato da *Guapira graciliflora* Mart. ($\mu\text{g/mL}$).



Legenda: Tempo de exposição; Concentrações utilizadas; Linhagens avaliadas (tumorais e não-tumorais).

Figura 6 – Proliferação das linhagens celulares em função da concentração do óleo essencial da *Schinus terebinthifolius* Raddi($\mu\text{g/mL}$).



Legenda: Tempo de exposição; Concentrações utilizadas; Linhagens avaliadas (tumoriais e não-tumoriais).

Tabela 3 - Valores de TGI (Total Growth Inhibition, concentração necessária para inibição de 100 % do crescimento celular) do extrato da *Guapira graciliflora* Mart. e do óleo essencial da *Schinus terebinthifolius* Raddi, sobre culturas de células tumorais humanas.

	Doxorrubicina ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Guapira</i> <i>graciliflora</i> Mart. ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Schinus</i> <i>terebinthifolius</i> Raddi ($\mu\text{g/mL}$)
U251/ Melanoma	0,18 ^(a)	120,14	74,15
MCF7/ Mama	0,15 ^(a)	96,32	74,02
NCI/ADR-RES/ Ovário Resistente	8,52 ^(a)	222,7	76,45
786-0/ Rim	0,32 ^(a)	150,49	78,98
NCI-H460/ Pulmão	0,32 ^(a)	221,01	135,98
PC-03/ Próstata	1,17 ^(a)	243,58	100,19
OVCAR-3/ Ovário	0,85 ^(a)	214,01	75,08
HT29/ Cólon	2,15 ^(a)	142,69	52,01
K-562/ Leucemia	1,28 ^(a)	>250	210,70
hAcAT/Queratinócitos	0,28 ^(b)	230,62	128,75
Mean TGI		>184,51	97,45

Nota: ^(a) Tumorais

^(b) Não tumorais

De maneira geral o óleo essencial dos frutos verdes de *S. terebinthifolius* apresentou maior atividade citostática (mean TGI= 97,45 $\mu\text{g/mL}$) do que o extrato de *G. graciliflora* (mean TGI=184,51 $\mu\text{g/mL}$). O óleo essencial inibiu de maneira bastante parecida a proliferação de várias das linhagens tumorais avaliadas sendo um pouco mais seletivo para a linhagem de tumor de cólon HT29 (TGI=52,01 $\mu\text{g/mL}$). Já o extrato apresentou um pouco mais seletivo (menor valor de TGI) para o tumor de mama MCF7 (TGI=96,32 $\mu\text{g/mL}$).

Com relação à linhagem não tumoral, ambas amostram seguiram o mesmo padrão observado para as células tumorais, ou seja, o óleo essencial apresentou um efeito citostático mais pronunciado sobre a linhagem HaCat (TGI=128,25 $\mu\text{g/mL}$) do que o extrato (TGI=230,62 $\mu\text{g/mL}$).

Em relação ao teste de hemólise, o extrato de *G. graciliflora* apresentou toxidez abaixo de 25% em relação ao controle positivo, em todas as concentrações testadas, o que indica que nenhuma das concentrações foi citotóxica efetiva 50% (EC50), ou seja, capaz de hemolisar 50% de uma suspensão a 5% de eritrócitos. O óleo essencial de *S. terebinthifolius* produziu 50% de hemólise a partir da concentração de 16mg/ml. (Tabela 4).

Tabela 4 -Distribuição dos valores percentuais da hemólise produzida pelo extrato da *Guapira graciliflorae* pelo óleo essencial da *Schinus terebinthifolius*, de acordo com as concentrações.

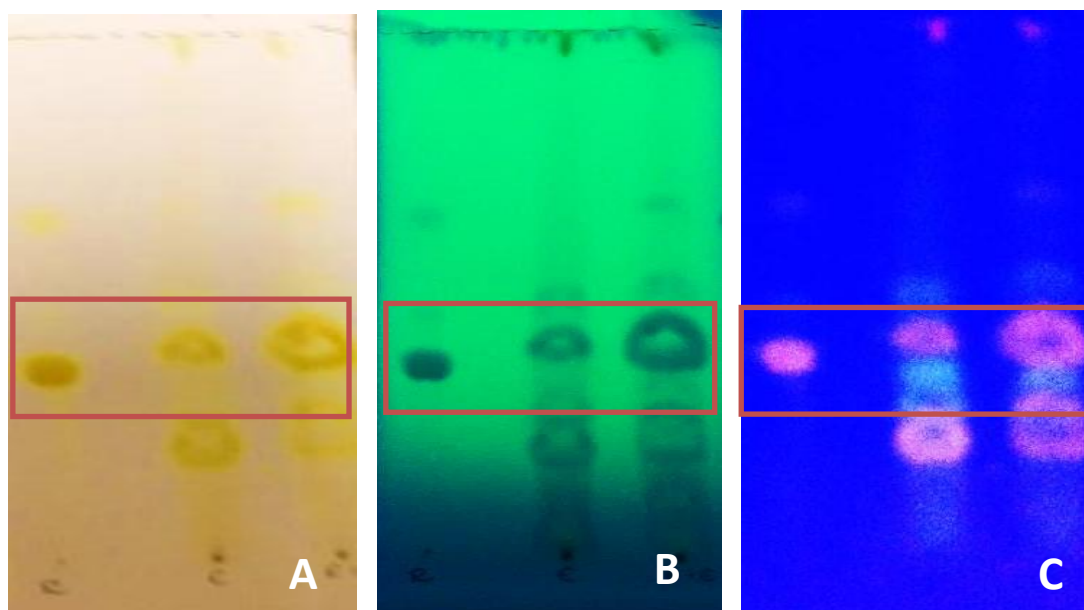
CLASSIFICAÇÃO DA HEMÓLISE DAS AMOSTRAS TESTADAS						
CONCENTRAÇÕES		16 mg/mL	8 mg/mL	4 mg/mL	2 mg/mL	1 mg/mL
<i>Guapira graciliflora</i> Mart.	% DA HEMÓLISE	22,81%	17,55%	16,52%	15,63%	10,98%
		-	-	-	-	-
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi		53%	46%	12,38%	11,26%	5,84%
		++	+	-	-	-

- (0% de hemólise), + (25% de hemólise), ++ (50% de hemólise), +++ (75% de hemólise) e ++++ (100% de hemólise)

O efeito hemolítico é dependente da concentração, porém na concentração ativa sobre o biofilme (1mg/mL) ambas as amostras não sofreram hemólise.

Em relação à caracterização química, foram revelados no extrato da *G.graciliflora* através da Cromatografia de Camada Delgada, a presença de compostos do grupo de flavonoides, com evidência da presença de Rutina por ponto misto (Figura 7).

Figura 7 - Cromatofolhas utilizadas na Cromatografia de Camada Delgada (CCD), vista a olho nu (A), em comprimento de onda de 254 nm (B) e 366nm (C).



Legenda: A primeira fila representa a rutina na sua forma pura, na segunda fila o extrato da *G. graciliflora* e na terceira fila a rutina pura e o extrato da *G. graciliflora* aplicados simultaneamente, confirmando a presença de flavonoide no extrato. A placa foi revelada com NP/PEG/macrogol.

A análise por CG-EM do óleo essencial de *S. terebinthifolius* revelou que seus compostos majoritários eram alfa e beta felandreno (Tabela 5, Figuras 6 e 7).

Tabela 5 - Analitos identificados no óleo essencial da *Schinus terebinthifolius* Raddi, por cromatografia gasosa acoplada a detector seletivo de massa.

t _R (min)	IR ^(a)	Identificação	% rel. ^(b)
5,61	933	alfa-pineno	15,91
7,10	991	beta-mirceno	1,07
7,57	1007	alfa-felandreno	37,05
8,18	1025	para-cimeno	5,35
8,35	1029	beta-felandreno	24,10
17,02	1252	n.i. ^(c)	2,05
26,43	1481	germacreno D	14,47

Notas: **a)** índice de retenção;

b) fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma;

c) não identificado.

Figura 8 – Cromatograma do óleo essencial da *Schinus terebinthifolius* Raddi.

Abundance

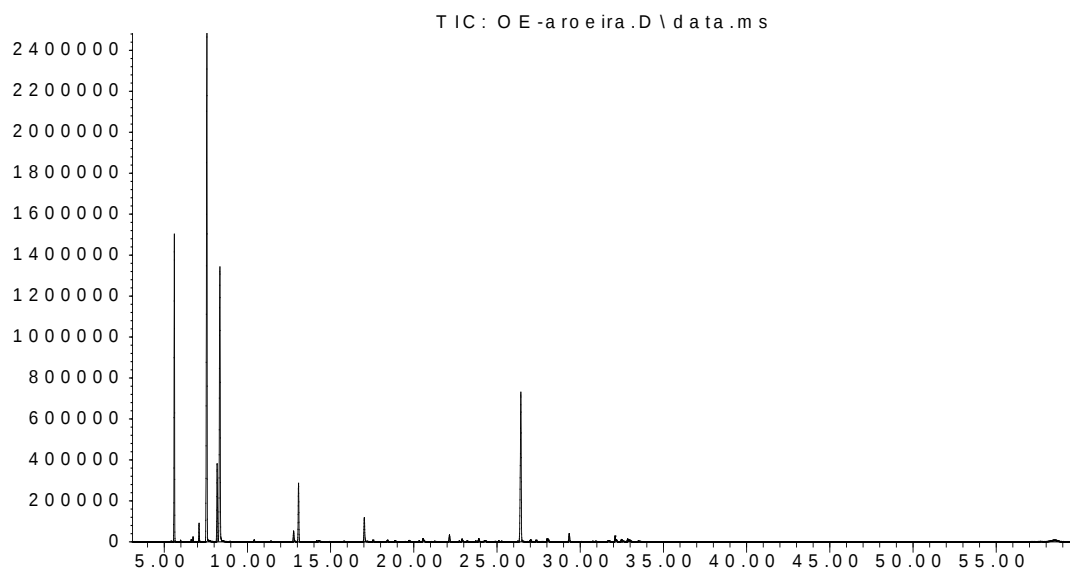
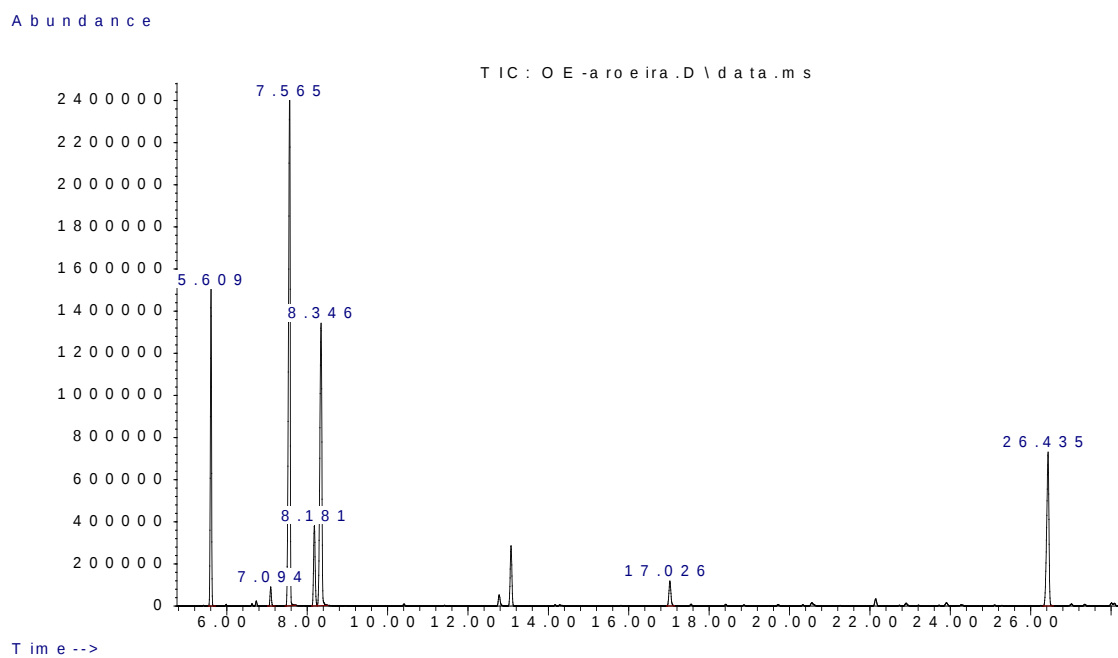


Figura 9 – Cromatograma expandido (5-27 min) do óleo essencial da *Schinus terebinthifolius* Raddi.



DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Na medicina tradicional, *G. graciliflora* e *S. terebinthifolius* são utilizadas para diferentes fins, como por exemplo, tratar inflamações e infecções (CORREIA *et al.*, 2006; AGRA *et al.*, 2008; PAIVA, ALOUFA, 2009; SIQUEIRA *et al.*, 2012). Nesta avaliação *in vitro*, o extrato das folhas de *G. graciliflora* e o óleo essencial dos frutos verdes de *S. terebinthifolius* apresentaram atividade antifúngica frente a *C. albicans*, cuja atividade foi considerada forte e moderada, respectivamente, conforme os critérios de classificação de Aligianis *et al.* (2001) e atividade antiproliferativa frente a todas as linhagens de células tumorais.

Essas atividades, possivelmente, foram decorrentes da ação isolada ou associada dos diferentes princípios ativos presentes nas plantas, representados pelos metabólitos secundários. Sabe-se que as propriedades farmacológicas de extratos vegetais estão associadas a sua composição química, proporção dos compostos, e interação entre os seus componentes (TRIPATHI, DUBEY, 2004; BAKKALI, 2008).

A avaliação fitoquímica do extrato das folhas de *G. graciliflora* e do óleo essencial dos frutos verdes de *S. terebinthifolius* revelou a presença de compostos químicos, cujas propriedades biológicas são reconhecidas na literatura (HAN, 2009; PEREIRA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2012; SIQUEIRA *et al.*, 2012; MACHADO, VALENTINI, 2014).

A análise química do extrato de *G. graciliflora* por cromatografia de camada delgada revelou a presença marcante de compostos de flavonoides, com fortes indícios da presença de rutina. Os flavonoides e taninos apresentam a habilidade de inativar enzimas e complexarem-se com proteínas extracelulares, proteínas solúveis e com a parede celular dos microrganismos, configurando os prováveis mecanismos de ação antimicrobiana. A total ruptura de membranas microbianas pode ser dada por flavonoides de caráter lipofílico (MENDES *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2012). O interesse pelos flavonoides tem aumentado à medida que suas atividades biológicas vão sendo descobertas. Estudos demonstraram que essas moléculas apresentam efeito antitumoral, antibacteriano, antiviral, antiinflamatório, antialérgico e vasodilatador (BOOTS *et al.*, 2008; MACHADO *et al.*, 2008).

A rutina pertence à subclasse dos flavonóis. É consumida diariamente na dieta e tem efeitos antioxidante e antimicrobiana além de diminuir a fragilidade ou permeabilidade capilar (BRUNETON, 1991; HOSSEINZADEH, NASSIRI-ASL, 2014). Em relação à atividade antimicrobiana, os resultados positivos do extrato das folhas de *G. graciliflora* frente a *C. albicans* podem ser parcialmente atribuídos à presença da rutina, com base em dados da literatura. Han (2009) demonstrou a eficiência da rutina no tratamento da artrite fúngica causada por *C. albicans*. Além disso, o estudo de Jobim *et al.* (2014) demonstrou a atividade antifúngica *in vitro*, frente a *C. albicans*, do extrato dos frutos de tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.), cujo marcador principal é a rutina. Esses autores também analisaram a atividade antimicrobiana *in vitro*, tanto da fração isolada do extrato como da rutina em sua forma padrão, demonstrando o efeito antifúngico desse composto.

Na análise fitoquímica do óleo essencial dos frutos verdes de *S. terebinthifolius* foram identificados diferentes componentes, sendo o α -felandreno e o β -felandreno os compostos majoritários. Esses compostos são hidrocarbonetos monoterpênicos com reconhecida atividade antimicrobiana (VILLA *et al.*, 1999; KOUKOS *et al.*, 2001; BAKKALI, 2008). O α -felandreno está associado, também, às propriedades anti-inflamatórias das plantas medicinais (BARBOSA *et al.*, 2007). O β -felandreno, geralmente, está presente como composto majoritário em óleos essenciais extraídos de folhas ou partes aéreas de diversas plantas (VELASCO-NEGUERUELA *et al.*, 2003; BERTINI *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2007; GOKALP *et al.*, 2012). Em estudo *in vitro*, Vila *et al.* (1999) testaram o óleo essencial das folhas do *Peumus boldus* frente a *Candida* sp., e encontraram significativa atividade antifúngica. Na análise fitoquímica do óleo foi encontrado o β -felandreno como um dos seus compostos majoritários.

O α -pineno constitui um dos marcadores principais do óleo essencial dos frutos da *S. terebinthifolius*, e pode representar um dos responsáveis pela forte atividade antifúngica deste óleo (MACHADO, VALENTINI, 2014), tendo sido identificado como o terceiro composto mais prevalente. Sua atividade antimicrobiana é atribuída à capacidade de afetar o metabolismo energético de mitocôndrias isoladas, por desacoplamento da fosforilação oxidativa ou inibição da cadeia transportadora de elétrons (ABRAHIM *et al.*, 2003; CHANG *et al.*,

2007). Leite (2007) avaliou o efeito inibitório do α -pineno sobre o crescimento de bactérias gram-positivas. Este autor verificou que este composto apresentou um efeito bacteriostático até 4 horas de exposição, sendo estabelecido o seu efeito cidal após 24 horas de exposição. Lang *et al.* (2012) também encontraram atividade antifúngica do α -pineno sobre cepas de *Candida spp.*

O germacreno-D constitui um dos componentes majoritários de óleos essenciais com atividade antimicrobiana, e está presente em diferentes espécies vegetais (GONZAGA *et al.*, 2003; IACOBELLI *et al.*, 2005). Entretanto, a sua atividade antimicrobiana pode ser limitada, uma vez que se mostrou inativo contra: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *C. krusei*, dentre outros. O composto isolado pode não ser responsável pela atividade antimicrobiana, no entanto, devido à sua lipofilia de hidrocarbonetos de estrutura terpênica, este composto pode ser uma variável importante na composição de óleos essenciais com vertentes antimicrobianas; uma vez que a sua partição nos lipídeos da membrana celular, aumenta a sua permeabilidade, facilitando a penetração dos demais compostos para o interior do microrganismo. Esta observação reforça a importância das interações positivas entre as moléculas ativas presentes numa amostra vegetal (BREHM-STECHER, JOHNSON, 2003)

O p-cimeno é um monoterpeno aromático, precursor do carvacrol, largamente presente entre os óleos essenciais, com reconhecida atividade antifúngica (LANG *et al.*, 2012). Apresenta propriedades lipolítica, herbicida, antimicrobianas e os seus derivados monoterpenos são eficazes antioxidantes e agentes anticarcinogênicos (BURT, 2004; KODALI *et al.*, 2008; MEDEIROS *et al.*, 2011).

A atividade antimicrobiana do extrato de folhas de *G. graciliflora* frente a diferentes espécies de bactérias foi constatada em outros estudos (COSTA *et al.* 2010; ROCHA *et al.* 2013), com resultados positivos para *S. aureus* e *E. coli* (ROCHA *et al.* 2013). Esses autores testaram o extrato bruto das folhas da *G. graciliflora*, utilizando-se o álcool etílico 70% como solvente o que pode ter contribuído para o resultado positivo. Chaves *et al.* (2013) testaram o extrato das cascas do caule de *G. graciliflora* frente aos microrganismos *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* e não observaram inibição de crescimento. Neste estudo, o extrato das folhas de *G. graciliflora* apresentou moderada atividade contra a *C. albicans*

(CIM = 250 µg/mL) e nenhuma atividade, até a concentração de 2000 µg/mL, contra as espécies bacterianas.

Apesar dos resultados da atividade antibacteriana do óleo essencial da *S. terebinthifolius* terem sido negativos, o seu potencial antimicrobiano foi avaliado anteriormente, apresentando resultados positivos tanto para bactérias como para leveduras: *Staphylococcus aureus* (DEGÁSPARI *et al.*, 2005; DOURADO, 2012; COLE *et al.*, 2014), *Escherichia coli* (DOURADO, 2012; COLE *et al.*, 2014), *Pseudomonas* sp., *Klebsiella oxytoca*, *Corynebacterium* sp., *Enterobacter* sp., *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus* sp., *Nocardia* sp. e *Streptococcus* do grupo D (COLE *et al.*, 2014), *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis*, *Lactobacillus casei* (ALVES *et al.*, 2008) e *C. albicans* (ALVES *et al.* 2013; FREIRES *et al.* 2011).

Esta diferença de resultados pode ser atribuída a diferentes fatores associados à planta, ao microrganismo, à metodologia, entre outros. As condições ambientais (radiação UV, alta temperatura, estresse hídrico), de cultivo, época de coleta do material vegetal, características genéticas, parte da planta analisada, método de obtenção do extrato são variáveis que devem ser consideradas (BARBOSA *et al.*, 2007; GOBBO-NETO, LOPES, 2007; NCUBE *et al.* 2010), uma vez que podem interferir na produção dos metabólitos secundários pelas plantas, cujos compostos são responsáveis pelas suas propriedades biológicas.

Por exemplo, o óleo essencial no estudo de Cole *et al.* (2014) e Dourado (2012) foi extraído de frutos maduros, cuja composição química foi diferente daquela encontrada no óleo deste estudo, extraído de frutos verdes. Cole *et al.* (2014) encontraram dezessete compostos, dentre os quais, muitos não foram identificados no presente estudo, como: δ -3-careno (30,37%), limoneno (17,44%), mirceno (5,82%), o-cimeno (3,46%), *E,E*- α -farneseno (1,77%), *trans*-cariofileno (1,77%), δ -cadineno (1,32%), Y-muuruleno (1,29%), isoterpinoleno (1,02%), beta-pineno (0,69%), sabineno (0,61%), epi- α -cadinol (0,60%) e carvacrol (0,30%).

Comparando os componentes dos óleos de frutos maduros e verdes, Barbosa *et al.* (2007) identificaram uma variação química, predominando no óleo dos frutos verdes os sesquiterpenos alfa-cadinol, alfa-cadineno, epi-alfa-

muurolol. Já nos frutos maduros foram identificados alfa-cadinol, elemol e germacreno-D, como predominantes. Observa-se que a proporção dos compostos presentes nos óleos pode variar de acordo com o estado de maturação do fruto (MELO *et al.*, 2014).

A diferença entre os resultados da atividade antimicrobiana do extrato da *G. graciliflora* e do óleo essencial da *S. terebinthifolius* frente às leveduras e bactérias, positivo para as leveduras e negativo para as bactérias, pode ser atribuída às características estruturais de cada microrganismo (CHERRY, 1999), onde disponibilizam diferentes alvos para os compostos ativos. A parede celular dos fungos é formada por uma camada externa de manoproteínas e uma camada interna estruturada com ligações de β -1,3-glicano e quitina, com algumas manoproteínas entreteçadas (BERGOLD, GEORGIADIS, 2004). No caso das bactérias, a parede celular das Gram-positivas é constituída por uma membrana revestida externamente por uma camada de peptídeoglicano (mucopeptídeo ou mureína). As gram-negativas além da camada de peptídeoglicano apresenta externamente uma cápsula de natureza polissacarídica (polissacarídeo extracelular) e polipeptídica (MURRAY, 2006).

Bakkali *et al.* (2008) observaram que os óleos essenciais com pequenas quantidades de hidrocarbonetos em sua composição são mais eficientes para bactérias, e os que apresentam majoritariamente hidrocarbonetos possuem melhores resultados na atividade antimicrobiana para as leveduras. A composição química do óleo essencial da *S. terebinthifolius* foi constituída predominantemente por hidrocarbonetos.

Os resultados positivos da atividade antifúngica das duas amostras vegetais frente a *C. albicans* são ainda incipientes, no entanto, promissores. Precisam ser investigados de forma mais ampla, incluindo outras espécies padronizadas de *Candida* e isolados clínicos recentes da cavidade oral, assim como, métodos mais complexos que identifiquem o mecanismo de ação dessas substâncias. As espécies *G. graciliflora* e *S. terebinthifolius* podem constituir uma fonte de princípios ativos para o desenvolvimento de produtos antimicrobianos para o controle e/ou tratamento da candidose oral.

Com a intenção de mimetizar o processo *overnight* de limpeza de prótese dentária total, usualmente recomendado aos pacientes, na clínica odontológica (BARNABÉ *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2006; CATÃO *et al.*, 2007; COELHO *et*

al., 2008; GONÇALVES *et al.*, 2011; JNANADEV *et al.*, 2011), foi produzido um biofilme monoespécie de *C. albicans*, de 48 horas, na superfície de discos de resina acrílica, para analisar o potencial antibiofilme do extrato da *G. graciliflora* e do óleo essencial da *S. terebinthifolius*. Para limpeza química da prótese utilizam-se agentes antimicrobianos para inibir o crescimento ou até mesmo matar os diferentes microrganismos formadores de biofilmes, principalmente, espécies de *Candida* (NALBANT *et al.*, 2008). Dessa forma, pesquisar substâncias que tenham boa ação em materiais sintéticos, como a resina acrílica, é de extrema importância, visto que alguns antimicrobianos podem perder sua eficácia quando expostos a presença de monômeros presentes nestes materiais (BUENO *et al.*, 2013).

O extrato das folhas de *G. graciliflora* e o óleo essencial dos frutos verdes de *S. terebinthifolius* reduziram, respectivamente, 96% e 98% o número de UFC/mL em relação ao grupo do controle de crescimento. Esses percentuais estão próximos daquele apresentado pela nistatina, que inibiu totalmente o crescimento de unidades formadoras de colônias. Identifica-se a necessidade de elaborar um novo desenho de estudo, incluindo um biofilme multiespécie, com diferentes espécies de *Candida* e bactérias da cavidade oral, como os *Streptococcus*, como forma de aproximar a condição *in vitro* do biofilme da realidade (GONÇALVES *et al.*, 2012; BUENO *et al.*, 2013; CAVALCANTI *et al.*, 2014; DE LUVENA-FERREIRA *et al.*, 2014; FAOT *et al.*, 2014; FREITAS-FERNANDES *et al.*, 2014).

Em relação à análise da atividade antiproliferativa do extrato de *G. graciliflora* e do óleo essencial de *S. terebinthifolius* sobre as células de linhagens tumorais, verificou-se uma atividade antiproliferativa, com inibição do crescimento total de quase todas as linhagens celulares, apenas na maior concentração.

A atividade antiproliferativa do extrato da *G. graciliflora* pode ser atribuída à presença de grupos fenólicos presentes na composição do seu extrato. Foi realizado um estudo *in vivo* com indução de displasia intestinal em ratos, para analisar o efeito anticarcinógeno da rutina e foi verificado que nos ratos tratados com dieta rica em rutina e quercetina, ocorria aumento no índice de células em apoptose, indicando um possível efeito inibitório dessas substâncias na carcinogênese do cólon (YANG *et al.* 2000). Outros estudos

com linhagens de células tumorais verificaram que a rutina inibe a proliferação e a viabilidade celular de forma concentração-dependente de células de glioblastoma multiforme humano (SCHECK *et al.*, 2006) e de glioblastoma da linhagem GL-15 (SANTOS *et al.*, 2011), assim como, induz a apoptose nessas células (SCHECK *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2011).

O efeito dos flavonoides também foi estudado na viabilidade e proliferação em células de glioma (GL-15). A proliferação das células GL-15 foi significativamente reduzida quando tratadas com os flavonóides crisina; 3',4'-dihidroxi-flavona; apigenina; kaempferol e rutina. Dentre os flavonóides estudados, foram destacados os flavonóides 3',4'-dihidroxi-flavona e a rutina, por terem reduzido de forma mais expressiva o número de células viáveis (SANTOS *et al.*, 2011). Tais resultados apontam essas substâncias como adjuvantes no tratamento de gliomas malignos (SCHECK *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2011). Esses resultados são promissores, especialmente, quando é considerada a incidência de câncer no mundo, onde já chegou a atingir 14,1 milhões de novos casos, com 8,2 milhões de mortes (SCHECK *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2011; FERLAY *et al.*, 2012).

A atividade antiproliferativa do óleo essencial das folhas de *S. terebinthifolius* foi identificada como positiva contra duas linhagens de células humanas: uma linha de câncer do cérebro (U251) e outra da mama MCF-7 (IBRAHIM *et al.*, 2004). Salvi Junior (2013), também, realizou testes de atividade antiproliferativa com o óleo essencial das folhas da *S. terebinthifolius* e também obteve resultados satisfatórios. Identificou atividade citocida para a linhagem PC-03 – próstata (63,0 µg/mL), U251 – glioma (179,9 µg/mL), HT29 – cólon (52,1 µg/mL). As concentrações citocidas para as linhagens PC-03 (próstata) e U251 (glioma) foram diferentes das encontradas neste estudo; isto pode ser atribuído às diferenças entre a composição do óleo essencial extraído das folhas e dos frutos.

Foi verificado que as concentrações da doxorrubicina necessárias para inibir as células das linhagens tumorais são mais baixas do que aquelas encontradas para as substâncias em teste. Isto pode ser justificado pelo fato da doxorrubicina ser um composto isolado e o extrato e o óleo essencial constituírem um grupo de moléculas ativas. De modo que, os resultados das substâncias vegetais podem ser decorrentes da ação de uma molécula ativa,

que pode estar presente em concentração próxima daquela concentração ativa da doxorubicina.

Os resultados positivos encontrados nas análises da atividade antimicrobiana e antiproliferativa não são suficientes para justificar a continuação dos estudos farmacológicos. São necessários testes toxicológicos, inicialmente, *in vitro*, como forma de garantir a segurança das substâncias em avaliação. Esses testes *in vitro* são utilizados como triagem toxicológica (BURT, 2004; BEDNARCZUK *et al.* 2010; BUSSMANN *et al.*, 2011).

Dentre os métodos iniciais de avaliação da toxicidade aguda *in vitro* encontra-se o teste de lise utilizando hemácias, onde são avaliados os parâmetros de lise das hemácias e desnaturação da hemoglobina. Os resultados da análise da hemólise do extrato de *G. graciliflora* e do óleo essencial de *S. terebinthifolius* foram satisfatórios, o que representa um dado de segurança no uso dessas substâncias *in vivo*. É um resultado positivo, uma vez que as substâncias foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* da *C. albicans*. e matar células de linhagens tumorais em baixas concentrações. Estes resultados reforçam a importância das indicações terapêuticas da planta como método alternativo. Os achados podem sinalizar o desenvolvimento de uma nova formulação com atividade antimicrobiana de uso odontológico no controle de patógenos orais.

A estabilidade mecânica da membrana dos eritrócitos é um bom indicador de danos *in vitro* em triagens de toxidez, já que as drogas podem alterar esta estrutura, fornecendo um modelo preliminar para o estudo de efeitos protetores e tóxicos de substâncias ou situações associadas com estresse oxidativo, sendo um possível indicador desse tipo de dano às células (SHARMA E SHARMA, 2001).

O extrato da *G. graciliflora* e o óleo essencial da *S. terebinthifolius* apresentaram resultados positivos nas análises da atividade antimicrobiana, antiproliferativa e de toxicidade. No entanto, é preciso a realização de outras pesquisas básicas e avançar nos estudos farmacológicos, com ensaios *in vitro* e *in vivo*, para comprovação de sua eficácia e segurança, com vistas ao desenvolvimento de uma nova formulação com propriedades anti-candida e/ou antiproliferativa para células tumorais.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

O extrato hidroalcoólico das folhas da *G. graciliflorae* o óleo essencial dos frutos verdes da *S. terebinthifolius* apresentam potencial antimicrobiano contra a *C. albicans*, na forma planctônica e organizada em biofilme; atividade antiproliferativa sobre as células de linhagens tumorais humanas; baixa toxicidade frente às hemácias e predominância de compostos fenólicos no extrato da *G. graciliflora* e de hidrocarbonetos no óleo da *S. terebinthifolius*.

Pretende-se divulgar os resultados deste trabalho, por meio de dois artigos científicos, a serem enviados para periódicos qualificados, de circulação internacional, como a Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (eCAM), Journal of Ethnopharmacology ou Archives of Oral Biology, considerando os seguintes planos de análise:

- Atividades antimicrobiana, antibiofilme de *C. albicans* e anticâncer do extrato hidroalcoólico das folhas de *Guapira graciliflora* Mart.
- Atividades antimicrobiana, antibiofilme de *C. albicans* e anticâncer do óleo essencial dos frutos verdes de *Schinus terebinthifolius* Raddi

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHIM, D.; FRANCISCHINI, A.C.; PERGO, E.M.; KELMER-BRACHT, A.M., ISHIIWAMOTO, E.L. Effects of α -pinene on the mitochondrial respiration of maize seedlings. ***Plant Physiology and Biochemistry***, v. 41, p. 985-991, 2003.
- ALIGIANNIS, N. *et al.* Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v.40, p.4168-70, 2001.
- AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. ***J. Pharmacogn.*** v. 18, p. 472-508, 2008.
- ALVES, E. G.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. ***Quím. Nova.*** v. 31, n. 5, p. 1224-9, 2008.
- ALVES L. A.; FREIRES, I. A.; SOUZA, T. M.; CASTRO, R. D. In vitro activity of *Schinus terebinthifolius* (Brazilian pepper tree) on *Candida tropicalis* growth and cell wall formation. ***Acta Odontol Latinoam.***, v.25, n.3, p.287-92, 2012.
- ALVES, L. A.; FREIRES, I. DE A.; PEREIRA, T. M.; DE SOUZA A.; LIMA, E. D. E. O.; DE CASTRO, R. D. Effect of *Schinus terebinthifolius* on *Candida albicans* growth kinetics, cell wall formation and micromorphology. ***Acta Odontol Scand.***, v.71, n.3-4, p.965-71, 2013.
- ANAU KABIR, M.; ZULFIQAR AHMAD. *Candida* Infections and Their Prevention. ***ISRN Preventive Medicine***, 2013, Article, ID 763628.
- ANSARI, S. H.; SHIRZADI, E.; ELAHI, M. The Prevalence of fungal infections in children with hematologic malignancy in Ali-Asghar Children Hospital between 2005 and 2010. ***Iran J Ped Hematol Oncol.***, v.5, n.1, p.1-10, 2015.

ARNAUD, R. R.; SOARES, M. S. M.; SANTOS, M. G. C.; SANTOS, R. C. Estomatite Protética: Prevalência e correlação com idade e gênero. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 16, n.1, p.59-62, 2012.

BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; CLEMENTE, A. D.; PAULA, V. F.; ISMAIL, F. M. D. Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Química Nova**, v. 30, p. 1959-65, 2007.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food Chem. Toxicol.**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BARBOSA, L. C. A. *et al* . Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* raddi. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 8, 2007.

BERGOLD, A., GEORGIADIS, S. NOVIDADES EM FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS: UMA REVISÃO. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 2, p. 159 -172, 2004.

BARKLEY, F. A. A study of *Schinus* L. **Lilloa**, v. 28, p. 1-110, 1957.

BARNABÉ, W.; MENDONÇA NETO, T.; PIMENTA, F. C.; PEGORARO, L. F.; SCOLARO, J. M. Efficacy of sodium hypochlorite and coconut soap used as disinfecting agentes in the redution of denture stomatitis, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. **J Oral Reahabil**, 31(5), p. 453-9, 2004.

BEDNARCZUK, V. O.; VERDAM, M. C. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v.11, n.2. 2010.

BOOTS, A. W.; HAENEN, G. R.; BAST, A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. **Eur J Pharmacol**, v. 585, p.325–337, 2008.

BORBA, A. N.; MACEDO, M. Plantas medicinais usadas em saúde bucal pela comunidade do bairro Santa Cruz, Chapada dos Guimarães, MT, Brasil. **Acta. Boct. Bras.**, v.20, n.4, p.771-782, 2006.

BORNHAUSEN, R. **Ervas do sítio**. 2002. Disponível em: <<http://www.ervasdositio.com.br/enciclopedia/enciclopedia.asp>>. Acesso em: 29. Jun. 2015.

BRASIL. Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, jun. 2006.

BRASILEIRO, B. G.; PIZZIOLO, V. R.; RASLAN, D. S.; JAMAL, C. M.; SILVEIRA, D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Braz J of Pharma Sciences**, v. 42, n. 2, 2006.

BREHM-STECHER, B. F.; JOHNSON, E. A. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.47, n.10, p.3357-3360, 2003.

BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. *Fármacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar*. São Paulo: Santos, p. 417, 2010.

BRUNETON, J. *Elementos de fitoquímica y de farmacognosia*. Zaragoza: Acribia, p. 594, 1991.

BUENO, M. G.; URBAN, V. M.; BARBÉRIO, G. S.; SILVA, W. J.; PORTO, V. C.; PINTO, L.; NEPPELENBROEK, K. H. Effect of antimicrobial agents incorporated into resilient denture relines on the *Candida albicans* biofilm. **Oral Diseases**, 2013. doi:10.1111/odi.12207

BURT, S. A. Essential oils: The antibacterial properties and potential applications in foods – A review. **International Journal Food Microbiology**, v.94, p. 223-253, 2004.

BUSSMANN, J.; WOLFE, S. A.; SIEKMANN, A. F. (2011). Arterial-venous network formation during brain vascularization involves hemodynamic regulation of chemokine signaling. **Development**, v.138, p.1717-1726, 2011.

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

CASTRO, R. D.; LIMA, E. O.; FREIRES, I. A.; ALVES, L. A. Combined effect of Cinnamomum zeylanium blume essencial oil and nystatin on *Candida albicans* growth and micromorphology. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.12, n.2, p.149-156, 2013.

CATÃO, C. D. S; RAMOS, I. N. C; SILVA NETO, J. M; DUARTE, S. M. O; BATISTA, A. U. D; DIAS, A. H. M. Eficiência de substâncias químicas na remoção do biofilme em próteses totais. **Rev de Odontologia da Unesp**, v. 36, n. 1, p. 53-60, 2007.

CAVALCANTI, I. M. G.; RICOMINI FILHO, A. P.; LUCENA-FERREIRA, S. C.; DA SILVA, W. J.; PAES LEME, A. F.; SENNA, P. M.; DEL BEL CURY, A. A. Salivary pellicle composition and multispecies biofilm developed on titanium nitride by cold plasma. **Archives of Oral Biology**, v. 59, n. 7, p. 695-703, 2014.

CHANG, H. J.; KIM, H. J.; CHUN, H. S. Quantitative structure–activity relationship (QSAR) for neuroprotective activity of terpenoids. **Life Sciences**, v. 80, p. 835-841, 2007.

CHANDRA, J.; KUHN, D. M.; MUKHERJEE, P. K.; HOYER, L. L.; MCCORMICK, T.; GHANNOUM, M. A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture and drug resistance. **J Bacteriol.**, v. 183, n. 18, p. 5385-94, 2001.

CHAVES, T. P.; SANTANA, C. P.; VÉRAS, G.; BRANDÃO, D. O.; FELISMINO, D. C.; MEDEIROS, A. C. D.; TROVÃO, D. M. B. M. Seasonal variation in the production of secondary metabolites and antimicrobial activity of two plant species used in Brazilian traditional medicine. **Afr. J. Biotechnol.** v.12, p. 847-853, 2013.

CHERRY, J. P. (1999). Improving The Safety Of Fresh Produce With Antimicrobials. **Food Technol.** 53: 54-59.

CLSI, 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.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute, *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts*. vol. 22, no 2, CLSI document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, USA, 6th edition, 2008.

CLSI. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Norma M7-A6. Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico. 6.ed. Pennsylvania: NCCLS; 2005.

COELHO, L. G. C; SOUZA, L. V. N. F; OLIVEIRA, E. A; RODRIGUES, S. M; VARGAS, A. M. D; FERREIRA E. F. Ação antimicrobiana de soluções de uso doméstico sobre a espécie *Candida albicans* proveniente de cultura de estoque da cavidade bucal de idosos. **Arquivos em Odontologia**, v. 44, n. 1, p. 5-9, 2008.

COLE, E. R. *et al.* Chemical composition of essential oil from ripe fruit of *Schinus terebinthifolius* Raddi and evaluation of its activity against wild strains of hospital origin. **Braz. J. Microbiol.**, v.45, n.3, p. 821-828, 2014.

COLOMBO, A. L. *et al.* Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 2816–2823, 2006.

CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Química Nova**, v. 29, p. 1287-1300, 2006.

COSTA, C. O. D'S. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de *Myracrodruon urundeuva* Allemão e *Schinus terebinthifolius* Raddi. 2011.

COSTA, J. G. M. *et al.* Biological screening of araripe basin medicinal plants using *Artemia salina* Leach and pathogenic bacteria. **Pharmacogn Mag**, v. 6, n. 24, p. 331-334, 2010.

CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. The New York Botanical Garden, 1262p, 1981.

DEGÁSPARI, C. H., WASZCZYNSKYJ, N., PRADO, M. R. M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Ciênc.agrotec.**, v. 29, n. 3, p. 617-622, 2005.

DE LUCENA-FERREIRA, S. C.; RICOMINI-FILHO, A. P.; DA SILVA, W. J.; CURY, J. A.; DEL BEL CURY, A. A. Influence of immersion in denture cleanser on multispecies biofilme. **Clinical Oral Investigations**, v. 18, n. 9, p. 2179- 2185, 2014.

DESOTI, V. C.; MALDANER, C. L.; CARLETTO, M. S.; HEINZ, A. A.; COELHO, M. S.; PIATI, D.; TIUMAN, T. S. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do Paraná. **Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR**, v. 15, n. 1, p. 3-13, 2011.

DOURADO, M. T. **Óleos essenciais e oleoresina da pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi): propriedades químicas e biológicas.** Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Rev Multi Ciencia**, n.7, 2006.

ESEBELAHIE, N.O.; ENWEANI, I.B.; OMOREGIE, R. *Candida* colonisation in asymptomatic HIV patients attending a tertiary hospital in Benin City, Nigeria. **Libyan Journal of Medicine**. v.18, n.8, p.1-5, 2013.

ESTEVÃO, L. R.; MENDONÇA, F. D. E. S.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; SIMÕES, R. S.; BARROS, M. E.; ARANTES, R. M.; RACHID, M. A.; EVÊNCIO-NETO, J. Effects of aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) oil on cutaneous wound healing in rats. *Acta Cir Bras.*, v.28, n.3, p.202-9, 2013.

FAOT, F.; CAVALCANTI, Y. W.; BERTOLINI, M. M; PINTO, L. R.; SILVA, W. J.; DEL BEL CURY, A. A. Efficacy of citric acid denture cleanser on the *Candida albicans* biofilm formed on poly(methyl methacrylate): effects on residual biofilm and recolonization process. **BMC Oral Health**, v. 14:77, 2014.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; ERVIK, M.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; *et al.*, 2013. GLOBOCAN 2012 1.0. International agency for research on cancer. <<http://www.globocan.iarc.fr>> (acessado 20.05.15).

FERREIRA, G. L. S.; PÉREZ, A. L. A. L.; ROCHA, I. M.; PINHEIRO, M. A.; CASTRO, R. D.; CARLO, H. L.; LIMA, E. O.; CASTELLANO, L. R. Does Scientific Evidence for the Use of Natural Products in the Treatment of Oral Candidiasis Exist? A Systematic Review. **Evid. Based. Complement. Alternat. Med.** V. 2015, 2015. ID: 147804

FOUCHE, G.; CRAGG, G. M.; PILLAY, P.; KOLESNIKOVA, N.; MAHARAJ, V.J.; SENABE, J. *In vitro* anticancer screening of South African plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.119, n.3, p.455–461, 2008.

FREITAS-FERNANDES, F. S.; CAVALCANTI, Y. W.; FILHO, A. P. R.; SILVA, W. J.; DEL BEL CURY, A. A.; BERTOLINI, M. M. Effect of daily use of an enzymatic denture cleanser on *Candida albicans* biofilms formed on polyamide and poly (methyl methacrylate) resins: An *in vitro* study. **J Prosthet Dent**, 2014.

FREIRES, I. A.; BUENO-SILVA, B.; GALVÃO, L. C. C.; DUARTE, M. C. T.; SARTORATTO, A.; FIGUEIRA, G. M.; ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. The Effect of Essential Oils and Bioactive Fractions on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* Biofilms: A Confocal Analysis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (Print)**, v. 2015, p. 1-9, 2015.

FREIRES, I. A.; MURATA, R. M.; FURLETTI, V. F.; SARTORATTO, A.; ALENCAR, S. M.; FIGUEIRA, G. M.; OLIVEIRA RODRIGUES, J. A.; DUARTE, M. C. T.; ROSALEN, P. L.. Coriandrum sativum L. (Coriander) Essential Oil: Antifungal Activity and Mode of Action on *Candida* spp., and Molecular Targets Affected in Human Whole-Genome Expression. **Plos One**, v.9, p. e99086-13, 2014.

FREIRES, I. DE. A.; ALVES, L. A.; FERREIRA, G. L.; JOVITO, V. DE. C.; DE CASTRO, R. D.; CAVALCANTI, A. L. A Randomized Clinical Trial of Schinus terebinthifolius Mouthwash to Treat Biofilm-Induced Gingivitis. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2013:873907, 2013.

FREIRES, I. A.; ALVES, L. A.; JOVITO, V. C.; CASTRO, R. D. Atividade antifúngica de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) sobre cepas do gênero *Candida*. **Rev Odontol Bras Central**, v. 52, n. 20, 2011.

FREIRES, I. A.; ALVES, L. A.; JOVITO, V. C.; ALMEIDA, L. F. D.; CASTRO, R. D.; PADILHA, W. W. N. In vitro antibacterial and antiadherent activities of tinctures from *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) and *Solidago microglossa* (Arnica) on dental biofilm forming bacteria. **Odontol. Clín.-Cient.**, v. 9, n. 2, p. 139-143, 2010.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. Production of plant secondary metabolites in plant cell and tissue culture: the example of *Tabernaemontana* and *Aspidosperma* genera. **Rev. bras. farmacogn.** v.18 n.4, 2008.

GILBERT, B & FAVORETO, R. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Tecnologia em Fármacos - Far - Manguinhos/FIOCRUZ, **Revista Fitos**, v.6, n. 1, 2011.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Medicinal Plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Quím.Nova**, v. 30, n.2, p. 374-381, 2007.

GOKALP, I.; NESE, K.; FATIH, D.; BETIL, D.; YOSHIKI, N.; K. HUSNU CAN BASER. Biotransformation of (-)-(R)- α -Phellandrene: Antimicrobial Activity of Its Major Metabolite. **Chem. & Biodiversi.** v.9, n.8, p. 1525-1532, 2012.

GONÇALVES, L. F. F.; SILVA NETO, D. R.; BONAN, R. F.; CARLO, H. L.; BATISTA, A. U. D. Higienização de próteses totais e parciais removíveis. **Rev Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 1, p. 87-94, 2011.

GONÇALVES, L. M.; DEL BEL CURY, A. A.; SARTORATTO, A.; GARCIA REHDER. V. L.; SILVA, W. J. Effects of Undecylenic Acid Released from Denture Liner on *Candida* Biofilms. **J Dent Res**, v.91, n.10, p.985-989, 2012.

GONÇALVES, S. S.; AMORIM, C. S.; NUCCI, M.; PADOVAN, A. C. B.; BRIONES, M. R. S.; MELO, A. S. A.; COLOMBO, A. L. Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex:

results from a nationwide surveillance of candidaemia in Brazil. **Clin Microbiol Infect**, v.16, p. 885-887, 2010.

GONZAGA, W. A.; WEBER, A. D.; GIACOMELLI, S. R.; SIMIONATTO, E.; DALCOL, I. I.; DESSOY, E. C.; MOREL, A. F. Composition and antibacterial activity of the essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Planta Med.**, v.69, n.8, p.773-775, 2003.

GUDLAUGSSON, O.; GILLESPIE, S.; LEE, K.; VANDE BERG, J.; HU, J.; MESSER, S.; HERWALDT, L.; PFALLER, M.; DIEKEMA, D. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. **Clin Infect Dis**, v.37, n.9, p.1172-7, Nov 1, 2003.

HAN, Y., Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. **International Immunopharmacology**, v. 9, p. 207-211, 2009.

HOSSEINZADEH, H.; NASSIRI-ASL, M. Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid. **J Endocrinol Invest**. v.37(9), p.783-8. 2014. doi: 10.1007/s40618-014-0096-3.

IACOBELLIS, N. S.; LO CANTORE, P.; CAPASSO, F.; SENATORE, F. Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. **J. Agric. Food Chem.**, v.53, n.1, p.57-61, 2005.

IBRAHIM, M. A. et al. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. **Agricultural and Food Science**, v. 10, p.243-259, 2004.

IWAMOTO, L.H.; VENDRAMINI-COSTA, D.B.; MONTEIRO, P.A.; RUIZ, A.L.; SOUSA, I.M.; FOGLIO, M.A.; DE CARVALHO, J.E.; RODRIGUES, R.A. Anticancer and Anti-Inflammatory Activities of a Standardized Dichloromethane Extract from *Piper umbellatum* L. Leaves. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2015; 2015:948737. doi: 10.1155/2015/948737.

JOBIM, M. L.; SANTOS, R. C. V.; ALVES, C. F. S.; OLIVEIRA, R. M.; MOSTARDEIRO, C. P.; SAGRILLOA, M. R.; FILHO, O. C. S.; GARCIA, L. F. M.; MANICA-CATTANI, M. F.; RIBEIRO, E. E.; CRUZ, I. B. M. Antimicrobial

activity of Amazon *Astrocaryum aculeatum* extracts and its association to oxidative metabolism. ***Microbiological Research***, v.169, p. 314–323, 2014.

JNANADEV, K. R; SHILPA SHETTY, S; SHEETAL, H. S. Disinfecting the acrylic resin plate using electrolyzed acid water and 2% glutaraldehyde: a comparative microbiological study. ***J Indian Prosthodont Soc***, v. 11, n. 1, p. 36–44, 2011.

JOHANN, S.; SÁ, N. P.; LIMA, L. A.; CISALPINO, P. S.; COTA, B. B.; ALVES, T. M.; SIQUEIRA, E. P.; ZANI, C. L. Antifungal activity of schinol and a new biphenyl compound isolated from *Schinus terebinthifolius* against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. ***Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials***, v. 9, 2010.

JUNQUEIRA, J. C.; VILELA, S. F. G; ROSSONI, R. D.; BARBOSA, J. O.; COSTA, A. C. B. P.; RASTEIRO, V. M. C.; SULEIMAN, J. M. A. H.; JORGE, A. O. C. ORAL COLONIZATION BY YEASTS IN HIV-POSITIVE PATIENTS IN BRAZIL. ***Rev. Inst. Med. Trop.***, v.54, n.1, p.17-24, 2012. doi: 10.1590/S0036-46652012000100004.

KEDZIERSKA, J.; WEGRZYN, J.; KEDZIERSKA, A.; PIETRZYK, A. Bacterial and fungal bloodstream infections in patients at the University Hospital of Cracow. ***MedDosw Mikrobiol***, v.55, n.3, p.259-70, 2003.

KODALI, S.; CAKIR, A.; OZER, H.; CAKMAKCI, R.; KESDEK, M.; METE, EBRU.; Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. ***Bioresource Technology***, v. 99, p. 8788-8795, 2008.

KOUKUS, P. K.; PAPADOPOULOU, K. I.; PAPAGIANNPOULOS, A. D.; PATIAKA, D. T. Chemicals from Greek forestry biomass constituents of the leaf oil of *Myrtus communis* L. grown in Greece. ***Journal of Essential Oil Research***, v. 13, p. 245-246, 2001.

KRISHNAN, P. A. Fungal infections of the oral mucosa. ***Indian Journal of Dental Research***, v.23, n.5, p.650-659, 2012.

LAFHEY, S. F.; BUTLER, G. Phenotype switching affects biofilm formation by *C. parapsilosis*. **Microbiology**, v.151, p.1073–1081, 2005.

LANG, G.; BUCHBAUER, G. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. **Flavour Frag. J.**, v. 27, p. 13-39, 2012.

LANZONI, T. A. **Efeito de extratos das folhas de *Schinus terebinthifolius Raddi* (Aroeira) sobre lesões transfixantes induzidas na língua de ratos.** Dissertação (Mestrado). Programa de Pós- Graduação em Odontologia. Universidade Católica de Paraná, Curitiba, 2007.

LEITE, A. M. *et al* . Inhibitory effect of beta-pinene, alpha-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 43, n. 1, 2007.

LIMA, I. O. *et al*. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 197-201, abr./jun. 2006.

LIMA, L. B.; VASCONCELOS, C. F. B.; MARANHÃO, H. M. L.; LEITE, V. R.; FERREIRA, P. A.; ANDRADE, B. A.; ARAÚJO, E. L.; XAVIER, H. S.; LAFAYETTE, S. S. L.; WANDERLEY, A. G. Acute and subacute toxicity of *Schinus terebinthifolius* bark extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, p. 468-73, 2009.

LIMA, R. F.; ALVES, E. P.; ROSALEN, P. L.; RUIZ, A. L. T. G.; DUARTE, M. C. T.; GÓES, V. F. F.; MEDEIROS, A. C. D.; PEREIRA, J. V. P.; GODOY, G. P.; COSTA, E. M. M. B. C. ANTIMICROBIAL AND ANTIPROLIFERATIVE POTENTIAL OF *Anadenanthera Colubrina* (Vell.)Brenan. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2014. Article, id: 802696.

LONGATO, G. B. **Atividade anticâncer de extratos brutos e frações ativas obtidos de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. Var. *regnellii*** Giovana Barbarini Longato. – Campinas, SP: Dissertação de Mestrado, 2010.

LONGHINI, R. *et al*. Antifungal activity evaluation of different propolis extracts. **Rev. bras. farmacogn.**, v.17, n.3, p.388-95, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. 2008 - **Plantas Medicinais no Brasil**. 2ª edição. Instituto Plantarum, Nova Odessa. v.2, p. 269-270, 2008.

LUIZE, P. S.; TIUMAN, T. S.; MORELLO, L. G.; MAZA, P. K.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P. et al. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 41, n. 1, jan./mar., 2005.

MACHADO, B. C. T.; VALENTINI, S. A. Avaliação do potencial farmacotécnico e antimicrobiano de diferentes extratos da Aroeira Pimenteira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Rev. Saúde e Biol.**, v.9, n.1, p.34-42, 2014.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Bol. Cent. Biol Reprod.** v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.

MATSUO, A. L.; FIGUEIREDO, C. R.; ARRUDA, D. C.; PEREIRA, F. V.; SCUTTI, J. A.; MASSAOKA, M. H.; TRAVASSOS, L. R.; SARTORELLI, P.; LAGO, J. H. α -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.411, n.2, p.449-54, 2011.

MEDEIROS, M.G.F; SILVA, A. C. CITÓ, A. M. G. L. BORGES, A.R.; LIMA, S.G., LOPES, J. A. D.; FIQUEIRDO, R. C. B. Q. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitology International**, v.60, p 237-241, 2011.

MELO, A. D. B. et al. Composição e atividade antimicrobiana do óleo essencial da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) com vistas ao uso como antimicrobiano para leitões desmamados. **Rev. Acad. Ciênc. Agrár. Ambient.** v. 12, n. 3, p. 227-232, 2014.

MENDES, L. P. M.; MACIEL, K. M.; VIEIRA, A. B. R.; MENDONÇA, L. C. V.; SILVA, R. M. F.; ROLIM-NETO P. J.; BARBOSA, W. L. R.; VIEIRA, J. M. S. Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Rev Ciên Farm Básica Apl.** v. 32(1), p. 121-5, 2011.

MORTON, J. F. Brazilian Pepper: Its impact on people, animals and the environment. ***Economy Botany***, v. 32, p. 353-9, 1978.

MOTTA, A. L.; ALMEIDA, G. M. D.; JUNIOR, J. N. A.; BURATTINI, M. N.; ROSSI, F. Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. ***Braz J Infect Dis***, v.14, n.5, p. 441-448, 2010.

MURRAY, P. R. **Microbiología médica**. Elsevier Brasil, 2006.

NALBANT, A. D; KALKANCI, A; FILIZ, B; KUSTIMUR, S. Effectiveness of Different Cleaning Agents against the Colonization of Candida spp. and the in Vitro Detection of the Adherence of These Yeast Cells to Denture Acrylic Surfaces. ***Yonsei Med J***, v. 49, n. 4, p. 647-54, 2008.

NCUBE, B.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. Seasonal variation in antimicrobial and phytochemical properties of frequently used medicinal bulbous plants from South Africa. ***S. Afr. J. Bot***, v. 79, n. 2, p. 1-10, 2010.

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

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. ***J Nat Prod***. v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

OKEKE, I. N.; LAXMINARAYAN, R.; BHUTTA, Z. A.; DUSE, A. G.; JENKINS, P.; O'BRIEN, T. F.; PABLOS-MENDEZ, A.; KLUGMAN, K. P. Antimicrobial resistance in developing countries. Part I: recent trends and current status. ***Lancet Infect Dis.***, v.5, n.8, p. 481-93, 2005.

OLCZAK-KOWALCZYK, D.; PYRŻAK, B.; DĄBKOWSKA, M.; PAŃCZYK-TOMASZEWSKA, M.; MISZKURKA, G.; ROGOZIŃSKA, I.; SWOBODA-KOPEĆ, E.; GOZDOWSKI, D.; KALIŃSKA, A.; PIRÓG, A.; MIZERSKA-WASIAK, M.; ROSZKOWSKA-BLAIM, M. Candida spp. and gingivitis in children with nephrotic syndrome or type 1 diabetes. ***BMC Oral Health***, 2015. doi: 10.1186/s12903-015-0042-6.

OLISCOVICZ, N. F.; POMARICO, L.; DE ARAÚJO CASTRO, G. F.; SOUZA, I. P. Effect of highly active antiretroviral therapy use on oral manifestations

in pediatric patients infected with HIV. **Indian J Dent Res.**, v.26, n.2, p. 200-204, 2015. doi: 10.4103/0970-9290.159169.

PAIVA, A. M. S.; ALOUFA, M. A. I. Estabelecimento *in vitro* de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi) em diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). **Rev. Bras. de Plant. Med.**, v.11, n.3, p.300-4, 2009.

PÁL, S.; NAGY, S.; BOZÓ, T.; KOCSIS, B.; DÉVAY, A. Technological and biopharmaceutical optimization of nystatin release from a multiparticulate based bioadhesive drug delivery system. **Euro.J.of Pharma.Scienc.**, v.49, n.2, p. 258-264. 2013.

PAPPAS, P. G.; REX, J. H.; LEE, J.; HAMILL, R. J.; LARSEN, R. A.; POWSERLY, W.; KAUFFMAN, C. A.; HYSLOP, N.; MANGINO, J. E. *et al.* A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. **Clin Infect Dis**, v.37, p. 634–643, 2003. DOI: 10.1086/376906

PATHAK, A. K.; SHARMA, S.; SHRIVASTVA, P. Multi-species biofilm of *Candida albicans* and non-*Candida albicans* *Candida* species on acrylic substrate. **J Appl Oral Sci**, v. 20, n. 1, p. 70-5, 2012.

PEREIRA, E. M.; GOMES, R. T.; FREIRE, N. R.; AGUIAR, E. G.; BRANDÃO, M. D.; SANTOS, V. R. In vitro antimicrobial activity of Brazilian medicinal plant extracts against pathogenic microorganisms of interest to dentistry. **Planta Med**, v.77, n.4, p.401-4, 2011.

PÉREZ, A. L. A. L.; CARDOSO, A. M. R.; CAVALCANTI, Y. W.; ALMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W. W. N. Antifungal Activity of Mouthwashes on *Candida* spp. **R bras ci Saúde**, v.15, n. 1, p.69-74, 2011.

RANARIO, J.C.; REDDICK, C.S.; PETERSON, J.D.; SMITH, J.L. Unilateral presentation of disseminated candidiasis: case report and review of the literature. **Cutis**, v.91, n.3, p. 137-40, 2013.

ROCHA, E.A.L.S.S., CARVALHO, A.V.O.R., ANDRADE, S.R.S., TROVÃO, D.M.M.B., MEDEIROS, A.C.D., *et al.* Potencial antimicrobiano de seis plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** v.34, n.3, p. 351-355, 2013.

RODMAN, J. E.; OLIVER, M. K.; KAMURA, R. R.; McMLAMMER JR., J. U.; BLEDSOL, A. H. A taxonomic analysis classification of Centrospermae. **Systematic Botany**, v.9, n.3, p.297-323, 1984.

ROJAS G., LÉVARO J., TORTORIELLO J., NAVARRO V. Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases, **J. of Ethnopharmacol.** v. 74, n. 1, p. 97-101, 2001.

ROVEDA, L. M.; FORMAGIO, A. S. N.; BALDIVIA, D. S.; SANTOS, L. A. C.; VIEIRA, M. C.; FOGGIO, M. A.; CARDOSO, C. A. L.; CARVALHO, J. E.; FORMAGIO NETO, F. Composição química e avaliação da atividade antitumoral do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **In Anonymous Anais do X Simpósio Brasil-Japão**, 2010.

SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; SERAFINI, L. A.; BUENO, M.; CRIPPA, L. B.; SARTORI, V. C.; DELLACASSA, E.; MOYNAS, P. Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 20, n. 2, 2010.

SANTOS, B. L.; SILVA, A. R. et al. "Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin on human glioblastoma cells." **Food Chemistry** 127(2): 404-411, 2011.

SANTOS, M. R. A.; LIMA, R. A.; FERNANDES, C. F.; SILVA, A. G.; LIMA, D. K. S.; TEIXEIRA, C. A. D.; FACUNDO, V. A. Insecticidal Activity of the Essential Oil of *Schinus terebinthifolius* Raddi on *Acanthoscelides obtectus* Say and *Zabrotes subfasciatus* Boheman. **Revista Fitos**. v.3, n.01, 2007.

SANTOS, O. J.; CESCHIN, A. P.; THIELE, E. S. Avaliação da ação da Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexigas de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 2, p.8-15, 2006.

SANTOS, O. J.; BARROS-FILHO, A. K.; MALAFAIA, O.; RIBAS-FILHO, J. M.; SANTOS, R. H.; SANTOS, R. A. *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) in the healing process of gastrorrhaphy in rats. **Arg Bras Cir Dig.**, v.25, n.3, p.140-6, 2012.

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.411-15, 2008.

SARDI, J.C.O.; VILAS-BOAS, P.; AGUIAR, N.; FONSECA, M.; THEOBALDO, J.; HÖFLING, J.F.; SAITO, D. *In vitro* Evaluation of Phospholipase and Proteinase of *Candida albicans* Isolated From Oral Cavity of Diabetic Patients. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v.15, n.1, p.9-12, 2013.

SARTORATTO A., MACHADO A.L.M., DELARMELINA C., FIGUEIRA G.M., DUARTE M.C.T., REHDER V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Braz. J. Microbiol.** v. 35, p. 273-280, 2004.

SCHECK, A. C.; PERRY, K.; HANK, N. C.; CLARK, W. D. Anticancer activity of extracts derived from the mature roots of *Scutellaria baicalensis* on human malignant brain tumor cells. **BMC Complement Altern Med**, v. 6, p. 27, 2006.

SHARMA, P. & SHARMA, J.D. In vitro hemolysis of human erythrocytes – by plant extracts with antiplasmodial activity. **J. Ethnopharm.** v.74, p.239-243, 2001

SIFUENTES-OSOMIO, J.; CORZO-LEÓN, D. E.; PONCE-DE-LEÓN, L. A. Epidemiology of Invasive Fungal Infections in Latin America. **Curr Fungal Infect Rep**, v. 6, p. 23-34, 2012. DOI 10.1007/s12281-011-0081-7.

SILVA, C. H.; PARANHOS, H. F. Efficacy of biofilm disclosing agente ando f three brushes in the controlo f complete denture cleasing. **J Appl Sci**, v.14, n.6, p. 454-9, 2006.

SILVA, M. J. D.; ENDO, L. H.; DIAS, A. L. T.; SILVA, G. A., SANTOS, M. H.; SILVA, M. A. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos e frações orgânicas de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. (Mimosaceae). **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, 33(2), p.267-274, 2012.

SILVA, R. F. Infecções fúngicas em imunocomprometidos. **J. bras. pneumol.** v.36, n.1, 2010.

SILVA JUNIOR, M. C. **100 Árvores do Cerrado: guia de campo**. Brasília: Ed. Rede de Sementes do Cerrado, p. 136-139, 2005.

SIQUEIRA, C. Q. F.; CABRAL, D. L. V. PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S.; AMORIM, E. L. C.; MELO, J. G.; ARAÚJO, T. A. S.; ALBUQUERQUE, U. P. Levels of Tannins and Flavonoids in Medicinal Plants: Evaluating Bioprospecting Strategies. **Evid- Based Compl. Alt.** 2012, doi: 10.1155/2012/434782.

SOUZA, V. C. & LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em AGP II**. Inst. Plantarum da Flora Brasileira, p.639, 2005.

STAHL, E.; KELLER, K.; BLINN, C. Cardanol, a skin irritant in ink pepper. **Planta Med.**, v. 48, p. 5-9, 1983.

STRAMANDINOLI, R.T.; SOUZA, P.H.C.; WESTPHALEN, F.H.; BISINELLI, J.C.; IGNÁCIO, S.A.; YURGEL, L.S. Prevalência de candidose bucal em pacientes hospitalizados e avaliação dos fatores de risco. **Rev Sul-Bras. de Odonto (Online)**, v.7, n.1, p.66-72, 2010.

TRIPATHI, P.; DUBEY, N.K. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. Review. **Postharvest Biology and Technology**, v.32, p.235-45, 2004.

VELASCO-NEGUERUELA, A.; PEREZ-ALONSO, M. J.; PEREZ DE PAZ, P. L.; PAUL-PALA, J.; SANZ, J. Analysis by gas chromatography-mass spectrometry of the essential oil from the areial parts of *Pimpinella junoniae* Ceb. & Ort., gathered in La Gomera, Canary islands, Spain. **J chromatogr A.**, v.1011, p.241-244, 2003

VILA, R.; VALENZUELA, L.; BELLO, H.; CANIGUERAL, S.; MONTES, M.; ADZET, T. Composition and antimicrobial activity of the essencial oil of *Peumus boldus* leaves. **Planta Med.** v.65, p.178-179, 1999.

WENZEL, R. P.; GENNINGS, C. Bloodstream infections due to *Candida* species in the intensive care unit: identifying especially high-risk patients to determine prevention strategies. ***Clin Infect Dis***, v.41, n. 6, p.S389-93, 2005.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S. M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R. P.; EDMOND, M. B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. ***Clin Infect Dis***, v.39, n.3, p.309-17, 2004.

YANG, K., LAMPRECHT, S. A., LIU, Y., SHINOZAKI, H., FAN, K., LEUNG, D., NEWMARK, H., STEELE, V. E., KELLOFF, G. J., LIPKIN, M. Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. ***Carcinogenesis***, v.21, n.9, p.1655-1660, 2000.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. ***Therapeutics and Clinical Risk Management***, v. 10, 2014.