



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA – UEPB
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – PRPGP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

CAROLINA MEDEIROS DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS POTENCIAIS ANTIFÚNGICO,
ANTIBIOFILME E ANTIPROLIFERATIVO DO EXTRATO DA *Guapira*
graciliflora Mart.**

Campina Grande

Junho de 2016

CAROLINA MEDEIROS DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS POTENCIAIS ANTIFÚNGICO,
ANTIBIOFILME E ANTIPROLIFERATIVO DO EXTRATO DA *Guapira
graciliflora* Mart.**

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

Junho de 2016

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.

A447a Almeida, Carolina Medeiros de.
Avaliação in vitro dos potenciais antifúngico, antibiofilme e antiproliferativo do extrato da *Guapira graciliflora* Mart. [manuscrito] / Carolina Medeiros de Almeida. - 2016. 86 p. : il. color.

Digitado.
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2016.
"Orientação: Profa. Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa, Departamento de Odontologia".

1. *Guapira graciliflora* Mart. 2. Plantas medicinais. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Medicamentos antitumorais. I. Título. 21. ed. CDD 615.321

CAROLINA MEDEIROS DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS POTENCIAIS ANTIFÚNGICO,
ANTIBIOFILME E ANTIPROLIFERATIVO DO EXTRATO DA *Guapira
graciliflora* Mart.**

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

DATA DE APROVAÇÃO: 09/06/2016

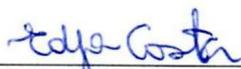
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen / FOP-UNICAMP
(1º Examinador)



Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy / UEPB
(2ª Examinador)



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

À minha orientadora, **Edja Costa**, pela maravilhosa oportunidade de crescimento, por todo o carinho, confiança e amizade. Dedico-lhe este trabalho.

Aos meus pais, **Eudo e Laura**, e meus avós, **Matias e Socorro**, meus exemplos de família, grandes amores da minha vida e a quem devo tudo o que sou. Dedico-lhes este trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, Senhor de todas as coisas, pois desde o início entreguei em Suas mãos a direção da minha vida, confiando sempre em Sua vontade e sabedoria. Sua fidelidade e justiça não falham. À Nossa Senhora, minha intercessora, que com seu manto sagrado guia meus passos e me protege de todo o mal.

Aos meus amados pais, Eudo e Laura, e avós maternos, Matias e Socorro, os meus bens mais preciosos e maiores fontes de inspiração. Por quem tanto luto para ser alguém melhor e poder retribuir todo o amor incondicional, esforço, incentivo e compreensão dispensados a mim em cada momento. A vocês todo o meu amor e gratidão!

Ao meu querido irmão, Rodolfo Medeiros, grande amigo e companheiro, que me incentiva a seguir sempre em frente com otimismo e determinação. Obrigada pela amizade e força durante toda a caminhada. Torço por sua felicidade e sucesso da mesma maneira que torces pelas minhas conquistas. Te amo!

À minha tia, madrinha e grande amiga, Laércia Medeiros, por todo o amor e carinho com que sempre me acalenta. Por cada palavra de conforto e força, por todo o apoio e cuidado materno durante esta jornada. Minha eterna admiração e amor pela pessoa iluminada que és!

Ao meu noivo e grande amor, Murilo Maia, pessoa que sonha meus sonhos junto comigo. Por ser um dos maiores incentivadores das minhas vitórias e se orgulhar de cada uma delas. Por toda compreensão nos momentos de ausência. Por acreditar em mim e me fazer crer todos os dias que sou capaz de realizar tudo aquilo que me propor a fazer. Por todo amor, respeito e amizade que nos une, obrigada por tudo. Amo você!

À minha querida orientadora, Edja Costa, grande exemplo de professora, mãe e mulher. És um verdadeiro presente que a vida acadêmica me deu. Por toda confiança depositada em mim. Pelas oportunidades únicas que me proporcionou, possibilitando a realização deste trabalho. Por cada conselho e palavra de conforto a mim direcionados. Por toda paciência, carinho e amizade com que sempre me tratou. Muito obrigada por tudo! Que Deus, em Sua infinita bondade, derrame bênçãos sobre sua vida e sobre a vida das pessoas que você ama. A você, a minha eterna gratidão e admiração!

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO) da Universidade Estadual da Paraíba, pela oportunidade de crescimento intelectual e profissional. Aos professores, por todo o conhecimento compartilhado e por todo o carinho e respeito.

Aos meus colegas de turma de mestrado, especialmente Fernanda Mariz, Hellen Bandeira, Hianne Morais, José Matheus, Lívia Brito e Matheus Perazzo, companheiros nesta jornada, com os quais tive o prazer de dividir cada conquista e vibrar com as vitórias de cada um. Construímos uma grande amizade e carregarei vocês sempre em meu coração. Obrigada por todo apoio e incentivo. Tenho certeza do futuro brilhante que aguarda a cada um. Sucesso e felicidade é o que desejo a todos vocês sempre!

Ao bolsista de pós-doutorado do PPGO, Yuri Wanderley Cavalcanti, por todo o apoio e ajuda dentro e fora do laboratório. Obrigada pela grande disponibilidade, sempre atendendo minhas dúvidas com paciência e boa vontade, pelas sugestões, pelas discussões, imensamente produtivas, e por todas as contribuições que ajudaram a compor este trabalho.

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA - UNICAMP) pela oportunidade única de aprendizado. Às queridas professoras Mary Ann Foglio, Ana Lúcia Tasca Góis Ruiz e Marta Cristina Teixeira Duarte e toda sua equipe, pela grande receptividade, atenção e auxílio na realização deste trabalho. Aos queridos Mariana Figueiredo, Humberto Spíndola, Vanessa Helena, Núbia Almeida, Ilza Oliveira, Rosana Basting, Elaine Cabral e Adriana Della Torre, que contribuíram de forma direta e indireta nesta pesquisa. A vocês, a minha eterna gratidão pela amizade, pelo acolhimento único, pela imensa disponibilidade e carinho durante nossos três meses de convivência. Deus foi muito generoso comigo ao colocar anjos como vocês no meu caminho. Vocês ficarão no meu coração para sempre!

À minha grande amiga Rennaly Lima, também companheira nesta jornada, pela grande amizade que nos une e por todo o carinho e apoio que me dedica. Amigos são bênçãos em nossa vida. Te levo sempre comigo e espero continuar tendo você ao meu lado dividindo cada vitória e vibrando a cada conquista.

À minha querida Érika Ponchet, pessoa muito especial, que tanto me ajudou e com quem aprendi muito do que pude pôr em prática durante a realização desta pesquisa. Por sua amizade, pela confiança e pelo aprendizado de vida. Torço muito pelo seu sucesso da mesma maneira que sei que torces pelo meu.

Ao querido colega de grupo de pesquisa Diego Romário e às queridas meninas da Iniciação Científica Arella Brito, Paolla Raymund, Priscila Guimarães, Tereza Vieira e Yane Marinheiro. Pela grata surpresa de poder conviver com pessoas especiais como vocês. Por toda a ajuda, dedicação, disponibilidade e carinho para comigo. Obrigada por tudo! Tenho orgulho de fazer parte deste grupo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD) pelas oportunidades e pelo auxílio financeiro que viabilizaram a realização desta pesquisa.

RESUMO

A *Guapira graciliflora* Mart. é uma planta medicinal, comumente encontrada na caatinga, no semi-árido brasileiro e bastante utilizada pela população local em função de suas atividades antituberculose, anti-inflamatória e cicatrizante. O objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* os potenciais antifúngico, antibiofilme e antiproliferativo da *G. graciliflora*. Foi obtido um extrato hidroalcolólico das folhas da *G. graciliflora* através do processo de maceração. Posteriormente foi realizado fracionamento através de coluna filtrante em funil de placa porosa. A caracterização química do extrato foi realizada através de Espectrometria de Massas com ionização por eletrospray (ESI-MS). A atividade antifúngica do extrato da *G. graciliflora* e de suas frações foi avaliada através do método da microdiluição em caldo com determinação das Concentrações Inibitória Mínima e Fungicida Mínima (CIM/CFM), frente à *Candida albicans* ATCC 10231; *Candida glabrata* CBS 07; *Candida krusei* CBS 573 e *Candida dubliniensis* CBS 7889. A capacidade em inibir a formação de um biofilme de *C. albicans* foi avaliada considerando o número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL), a atividade metabólica (MTT) e o potencial hidrogeniônico (pH). A atividade antiproliferativa do extrato e de suas frações foi avaliada sobre linhagens de células tumorais (U251, MCF-7, NCI-ADR/RES, 786-0, NCI-H460, PC-3, HT-29) e não-tumoral humanas (HaCaT) através do método da Sulforrodamida B. A citotoxicidade do extrato foi avaliada sobre a linhagem de macrófagos RAW 264.7 também pelo método da Sulforrodamina B. A caracterização fitoquímica do extrato indicou a presença sugestiva dos flavonoides rutina e kaempferol. O extrato e sua fração metanólica exibiram moderada atividade antifúngica sobre *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei* e forte atividade sobre *C. dubliniensis*. A análise da atividade metabólica e a contagem de células viáveis nos biofilmes de 24 e 48 horas demonstrou diferenças estatisticamente significativa ($p < 0,05$) apenas para a contagem de células viáveis em 24 horas e para a atividade metabólica em 48 horas, cujas concentrações do extrato de 125 $\mu\text{g/mL}$ e 62,5 $\mu\text{g/mL}$ foram as que mais reduziram o número de UFC/mL (34,1% e 36,9%, respectivamente) e a concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ foi a mais efetiva em diminuir a atividade metabólica (50,79%) das células de *C. albicans*. Os valores de pH observados nos biofilmes tratados com o extrato foram maiores do que naqueles sem tratamento. O extrato e suas frações não apresentaram efeito antiproliferativo sobre as linhagens tumorais testadas, com médias de atividade ($\log \text{GI}_{50}$) maior e igual a 1,71 $\mu\text{g/mL}$. A viabilidade celular dos macrófagos foi mantida acima de 80% para concentrações do extrato até 62,5 $\mu\text{g/mL}$. O extrato das folhas da *G. graciliflora* possui flavonoides em sua composição química.

Apresenta potenciais antifúngico e antibiofilme, sem evidências significativas de atividade antiproliferativa sobre linhagens de células tumorais e não tumorais humanas.

Palavras-chaves: *Guapira graciliflora* Mart. Plantas medicinais. Produtos com ação antimicrobiana. Ensaio de seleção de medicamentos antitumorais.

ABSTRACT

Guapira graciliflora Mart. is a medicinal plant, commonly found in the caatinga, in the Brazilian semi-arid and widely used by the local population because of their antituberculosis, anti-inflammatory and healing activities. The aim of this study was to evaluate *in vitro* the antifungal, antibiofilm and antiproliferative potential of *G. graciliflora*. A hydroalcoholic extract of *G. graciliflora*'s leaves was obtained. Then, the extract was fractionated by filter column on fritted funnel. The chemical characterization of the extracts was performed by Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS). The antifungal activity of *G. graciliflora* extract and its fractions was evaluated by broth microdilution method to determine the Minimum Inhibitory and Fungicidal Concentrations (MIC / MFC) against *Candida albicans* ATCC 10231; *Candida glabrata* CBS 07; *Candida krusei* CBS 573 and *Candida dubliniensis* CBS 7889. The ability to inhibit formation of a *C. albicans* biofilm was evaluated considering the number of colony forming units (CFU/ml), the cell metabolic activity (MTT) and hydrogenic potential (pH). The antiproliferative activity of the extract and its fractions were evaluated against human tumoral cell lines (U251, MCF-7, NCI-ADR/RES, 786-0, NCI-H460, PC-3, HT-29) and not tumoral cell line (HaCat) by Sulforhodamine B assay. The cytotoxicity of the extract was evaluated on the line RAW 264.7 macrophages also by Sulforhodamine B assay. The phytochemical characterization of the extract indicated the suggestive presence of the flavonoids rutin and kaempferol. The extract and its methanol fraction showed moderate antifungal activity against *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei* and strong activity against *C. dubliniensis*. The analysis about the metabolic activity and the number of viable cells at 24 and 48 hours biofilms showed difference ($p < 0,05$) only for the number of viable cells at 24 hours and the metabolic activity at 48 hours, with the extract's concentrations of 125 $\mu\text{g/mL}$ and 62,5 $\mu\text{g/mL}$ reducing the major number of CFU/mL (34,1% and 36,9%. respectively) and the concentration of 250 $\mu\text{g/mL}$ was the most effective in decrease the metabolic activity (50,79%) of *C. albicans* cells. The pH values observed in biofilms treated with the extract were higher than those observed in untreated biofilm. The extract and its fractions have no antiproliferative effect against tumor cell lines tested, with average activity (mean log GI_{50}) greater and equal to 1.71 mg/mL . Cell viability of macrophages was maintained above 80% for the extract concentrations up to 62,5 mg/mL . The extract of *G. graciliflora*'s leaves has flavonoids in its chemical composition. Also has antifungal and antibiofilm potential, without significance evidence of antiproliferative activity against tumor and not tumor cell lines.

Keywords: *Guapira graciliflora* Mart. Medicinal plants. Products with antimicrobial action. Antitumor drugs selection trials.

LISTA DE SIGLAS

ACAM	Arruda Câmara
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBS	<i>Central Bureau voor Schimmelcultures</i>
CC	Controle de Crescimento
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
DMSO	Dimetilsufóxido
ESI-MS	<i>Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>
FOP	Faculdade de Odontologia de Piracicaba
GI ₅₀	<i>Growth Inhibition 50</i>
HSV-1	Hesper Vírus Simples – tipo 1
ISO	<i>International Standard Organization</i>
MEC	Ministério da Educação
MCT	Ministério de Ciência e Tecnologia
MTT	Brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
NaCl	Cloreto de sódio
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PPGO	Programa de Pós-graduação em Odontologia
PROCAD	Programa Nacional de Cooperação Acadêmica
PRPGP	Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFB	Soro fetal bovino
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
SRB	Sulforrodamina B

TCA	Ácido tricloroacético
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

LISTA DE IMAGENS

Figura 1: Visão geral da *Guapira graciliflora* Mart. (A), das suas folhas (B) e dos seus frutos (C).

Figura 2: Sequência metodológica do estudo.

Artigo – ATIVIDADES ANTIFÚNGICA, ANTIBIOFILME E ANTIPROLIFERATIVA DA *Guapira graciliflora* Mart.

Figura 1: Espectro ESI(-) -MS obtido do extrato das folhas da *G. graciliflora*.

Figura 2: Espectro ESI(-)-MS/MS obtido para o íon de m/z 193.

Figura 3: Espectro ESI(-)-MS/MS obtido para o íon de m/z 593.

Figura 4: Espectro ESI(-)-MS/MS obtido para o íon de m/z 609.

Figura 5: Espectro ESI(-)-MS/MS obtido para o íon de m/z 1351.

Figura 6. Viabilidade celular e atividade metabólica, em 24 horas, de células de *C. albicans*, após a exposição a diferentes concentrações do extrato de *G. graciliflora*. **A.** Número de microrganismos viáveis de *C. albicans* (UFC/mL). **B.** Percentual de viabilidade celular *C. albicans* (UFC/mL) em função do controle de crescimento. **C.** Absorbância da atividade metabólica (570 nm). **D.** Percentual de atividade metabólica das células de *C. albicans* em função do controle de crescimento da levedura.

Figura 7. Viabilidade celular e atividade metabólica, em 48 horas, de células de *C. albicans*, após a exposição a diferentes concentrações do extrato de *G. graciliflora*. **A.** Número de microrganismos viáveis de *C. albicans* (UFC/mL). **B.** Percentual de viabilidade celular *C. albicans* (UFC/mL) em função do controle de crescimento. **C.** Absorbância da atividade metabólica (570 nm). **D.** Percentual de atividade metabólica das células de *C. albicans* em função do controle de crescimento da levedura.

Figura 8: Proliferação das linhagens celulares em função da concentração (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) após 48 horas de exposição ao quimioterápico Doxorubicina (controle positivo).

Figura 9: Proliferação das linhagens celulares em função da concentração (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) após 48 horas de exposição ao extrato da *G. graciliflora*.

Figura 10: Proliferação das linhagens celulares em função da concentração (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) após 48 horas de exposição à fração metanólica do extrato da *G. graciliflora*.

Figura 11: Proliferação das linhagens celulares em função da concentração (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) após 48 horas de exposição à sub-fração metanólica do extrato da *G. graciliflora*.

Figura 12: Proliferação das linhagens celulares em função da concentração (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) após 48 horas de exposição à fração hidrometanólica (50:50) do extrato da *G. graciliflora*.

Figura 13: Distribuição do percentual de viabilidade celular de linhagem de macrófagos RAW 264.7 de acordo com a concentração do extrato de *G. graciliflora*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Linhagens de células tumorais e não tumoral humanas utilizadas nos testes de avaliação da atividade antiproliferativa.

Artigo – ATIVIDADES ANTIFÚNGICA, ANTIBIOFILME E ANTIPROLIFERATIVA DA *Guapira graciliflora* Mart.

Tabela 1: Proposta de identificação das moléculas e os dados de massa de alta resolução obtidos para o extrato bruto da *G. graciliflora*.

Tabela 2: Distribuição dos valores das Concentrações Inibitória Mínima (CIM) e Fungicida Mínima (CFM) do extrato da *G. graciliflora* e suas frações, de acordo com a espécie de *Candida*.

Tabela 3: Análise de variância das variáveis dependentes correspondentes à atividade metabólica e à contagem de células viáveis em biofilmes após 24 e 48 horas.

Tabela 4: Distribuição dos valores do potencial hidrogeniônico obtidos das soluções de cultivo dos biofilmes de *C. albicans*, de 24 e 48 horas, na presença ou não de tratamento.

Tabela 5: Valores de GI_{50} (*Growth Inhibition 50* – concentração da amostra necessária para inibir 50% do crescimento celular) do extrato da *G. graciliflora* e de suas frações sobre cultura de células tumorais humanas.

SUMÁRIO

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	18
1.1 Plantas medicinais.....	18
1.2 Candidíase.....	19
1.3 Mecanismos de ação dos antifúngicos em espécies de <i>Candida</i>	22
1.4 <i>Guapira graciliflora</i> Mart.	24
2. OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3. METODOLOGIA	28
3.1 LOCAL DO ESTUDO.....	28
3.2 MATERIAL VEGETAL.....	29
3.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO.....	29
3.4 FRACIONAMENTO DO EXTRATO.....	29
3.4.1 Monitoramento inicial através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	29
3.4.2 Fracionamento em coluna filtrante em funil de placa porosa.....	30
3.5 ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO POR MEIO DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR ELETROSPRAY (ESI-MS).....	30
3.6 CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO.....	30
3.6.1 Microrganismos.....	31
3.6.2 Preparo do inóculo.....	31
3.6.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método da Microdiluição em Caldo.....	31
3.6.4 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	32
3.7 CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL DE INIBIÇÃO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	32
3.7.1 Substrato de adesão de biofilme.....	32
3.7.2 Preparo do inóculo.....	32
3.7.3 Análise de inibição de aderência do biofilme.....	32
3.7.4 Quantificação de células viáveis do biofilme.....	33
3.7.5 Avaliação da atividade metabólica (Ensaio do MTT).....	33
3.7.6 Avaliação do potencial hidrogeniônico (pH).....	34

3.8 CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO EM CULTURA DE CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS.....	34
3.9 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CULTURA DE CÉLULAS DE MACRÓFAGOS RAW 264.7.....	36
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
4. RESULTADOS.....	38
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68
REFERÊNCIAS GERAIS	
Anexo A – Normas do periódico Journal of Ethnopharmacology	

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1.1 Plantas medicinais

As plantas, ao longo da história, têm sido utilizadas como fonte de medicamentos para o tratamento de uma série de doenças humanas. Isto induziu a avanços no conhecimento científico sobre a eficácia terapêutica de produtos naturais, com descobertas de novos compostos bioativos (CRAGG et al., 2014). Assim, a utilização de constituintes derivados de plantas na área farmacêutica tem crescido de forma significativa, cujos resultados podem ser atribuídos à variedade das propriedades medicinais e a sua considerada toxicidade mínima ou nula, quando comparados à drogas sintéticas (TAN et al., 2015).

Em países desenvolvidos, cerca de dois terços da população fazem uso de plantas como fonte de medicamentos (COSTA et al., 2015). No Brasil, este fato também se constitui uma realidade, principalmente devido à expressiva biodiversidade vegetal do país. Nos últimos anos, pesquisas nessa área têm se destacado, com o intuito de respaldar cientificamente o uso dessas plantas na medicina tradicional, assim como, desenvolver novos produtos de aplicação clínica, considerando suas propriedades antimicrobiana (OLIVEIRA, J. R. et al., 2014), anticâncer (BRITTO et al., 2012; QUINTANS et al., 2013) e antioxidante (CASAGRANDE et al., 2014; VARGAS et al., 2016).

A utilização de plantas tem contribuído para os cuidados em saúde, na prevenção e/ou tratamento de doenças, especialmente as de natureza infecciosa, consideradas como grande ameaça à saúde pública. Isto pode ser decorrente dos estudos farmacológicos, que têm demonstrado a presença de agentes antimicrobianos em diversas plantas. Além disso, a população parece optar pelos produtos naturais, por conhecerem os efeitos secundários associados à utilização excessiva ou indiscriminada de medicamentos alopáticos, quando comparados àqueles advindos da natureza (ABDOLLAHZADEH et al., 2011; AKINPELU et al., 2015).

Após a determinação do potencial antimicrobiano de uma planta medicinal, é recomendável pesquisar o seu potencial *in vitro* em causar danos às células normais do hospedeiro, além do seu efeito sobre linhagens tumorais, com vistas ao desenvolvimento de um produto de uso terapêutico (RODEIRO et al., 2006). Estes ensaios biológicos são ferramentas essenciais para dar continuidade aos estudos que visam a busca por substâncias bioativas, na perspectiva de desenvolvimento de novos fármacos (PILATOVA et al., 2010; ZAKARIA et al., 2011).

Considerando que a maioria das doenças que acometem a cavidade oral são de origem microbiana e que a resistência por parte de alguns causadores de tais infecções aumentou consideravelmente (KUREK et al., 2012), o potencial de plantas medicinais e de produtos naturais para o tratamento destas doenças tem sido investigado com o objetivo de tratar ou reduzir infecções orais, de forma a garantir a sua indicação segura para a população em geral (LINS et al., 2013; FREIRES et al., 2014; LIMA et al., 2014; FERREIRA et al., 2015; FREIRES et al., 2015).

1.2 Candidíase

Dentre as infecções da cavidade oral, destaca-se a candidíase, causada por fungos do gênero *Candida*, considerada a infecção fúngica mais prevalente em humanos. Pode se manifestar na forma tópica ou sistêmica e envolver diferentes sítios do corpo humano, como as mucosas da cavidade oral e do trato genitourinário feminino (PELEG et al., 2010; GOW et al., 2011). As espécies do gênero *Candida* são microrganismos comensais e o estabelecimento da infecção está geralmente associado a fatores predisponentes, como comprometimento imunológico e utilização de antibióticos de largo espectro (PELEG et al., 2010; GOW et al., 2011; WILLIAMS et al., 2013).

Neste sentido, a perda do equilíbrio entre a imunidade do hospedeiro e a patogenicidade do microrganismo pode resultar num crescimento descontrolado de *Candida* sp, que além de causar infecções nas superfícies da pele e das mucosas, pode, de forma mais agressiva, invadir os tecidos mais profundos, disseminando a infecção para outros órgãos (SANTOS et al., 2013).

As espécies de *Candida* constituem um dos grupos de microrganismos mais isoladas em hospitais, sendo responsáveis por cerca de 10% das infecções adquiridas em unidades de tratamento intensivo e representam o terceiro ou quarto patógeno mais comum em infecções sistêmicas, podendo atingir um índice de mortalidade de 30% a 50% (PAPPAS et al., 2003; WISPLINGHOFF et al., 2004; PERLROTH et al. 2007; PFALLER et al., 2007). Além disso, a candidíase oral está presente em cerca de 80% a 90% de indivíduos portadores do vírus HIV, resultando no aumento da internação destes pacientes e das despesas médicas (FIDEL, 2011; SANTOS, 2010).

A incidência da candidíase nas últimas décadas gerou impacto negativo na saúde pública. O aumento da prevalência pode ser decorrente do crescente número de pacientes imunocomprometidos, da utilização de cateteres intravenosos, nutrição parenteral exclusiva,

ampla utilização de antibióticos de largo espectro, bem como, do aumento de infecções por espécies não-*albicans*, intimamente relacionadas à resistência antifúngica (ORTEGA et al., 2011; PFALLER et al., 2011; SILVA et al., 2012b; SARDI et al., 2013).

Fungos do gênero *Candida* são organismos eucariontes que possuem parede celular, composta por uma camada interna de quitina e β -1-3-glucano, sobre a qual outros polissacarídeos e glicoproteínas estão aderidos (ERWIG E GOW, 2016). Possuem morfogênese celular variada, podendo se apresentar na forma de levedura, hifa e/ou pseudohifa e podem se organizar em dois estilos de vida: planctônico e em biofilme (WONG et al., 2014).

A *C. albicans* é a espécie que mais se destaca na patogênese da candidíase, principalmente em função dos seus fatores de virulência, como a capacidade de diferenciação de levedura para hifa (dimorfismo), expressão de fatores de adesão e a secreção de enzimas hidrolíticas (SILVA et al., 2012b), favorecendo o seu desenvolvimento mais frequente, em relação às demais espécies (CORONADO-CASTELLOTE e JIMÉNEZ-SORIANO, 2013).

Estes fatores de virulência da *C. albicans* viabilizam a sua habilidade em formar biofilmes sobre uma variedade de superfícies, como prótese dentária e cateteres, passando a produzir uma matriz orgânica, polimérica que a protege da remoção por forças de cisalhamento e por agentes químicos. Além disso, quando aderida à superfícies bióticas, como as superfícies da mucosa, a *C. albicans* pode penetrar o epitélio através da liberação de enzimas hidrolíticas, ocasionando uma resposta inflamatória (THIELE et al., 2008).

Esta interação entre a *C. albicans* e as células epiteliais é responsável pela ativação do sistema imunológico, em que células fagocíticas, como macrófagos e neutrófilos, são ativadas. (HANI et al., 2015; CABEZON et al. 2016). Estas células possuem uma variedade de receptores de reconhecimento padrão que reconhecem fungos patogênicos (CUI et al., 2016), e desta forma, constituem a primeira linha de defesa contra infecções microbianas, impedindo o desenvolvimento da candidíase (SEIDER et al., 2010).

Os macrófagos são células que desempenham um papel essencial na manutenção da homeostase nos tecidos, por desenvolverem uma resposta primária frente aos patógenos (GORDON E TAYLOR, 2007). Sua relevância em relação à infecção causada por *C. albicans* é estudada (CABEZON et al., 2016; CUI et al., 2016; ERWIG E GOW, 2016), devido à sua capacidade em fagocitar e eliminar o fungo em sua forma de levedura, além de recrutar e ativar outras células relacionadas aos mecanismos de imunidade (GOW et al., 2011).

Estudos sobre a interação entre *Candida* e macrófagos podem fornecer informações a respeito de novos fatores de virulência que possam contribuir para o desenvolvimento de

novos tratamentos (CABEZÓN et al., 2009; FERNANDÉZ-ARENA et al., 2009), além de esclarecer os mecanismos de ação pelos quais o corpo humano pode desenvolver uma resposta imune à infecção causada por *Candida* (MARTÍNEZ-SOLANO et al. 2009; REALES-CALDERON et al., 2012; REALES-CALDERON et al., 2013; REALES-CALDERON et al., 2014; CABEZON et al., 2016).

Existem evidências de que fármacos derivados de produtos naturais possuem a capacidade de modular vários mediadores inflamatórios, incluindo seus efeitos na expressão de moléculas pró-inflamatórias, consideradas a chave da inflamação (OLIVEIRA, R. G. et al., 2014; DZOYEM et al., 2015; JANG et al., 2015; SUGATA et al., 2015; TAN et al., 2015), o que pode contribuir para a identificação de novos compostos que sejam seguros, para a prevenção e tratamento de processos inflamatórios (HUR et al., 2012).

A formação do biofilme de *Candida* ocorre basicamente em três fases: inicial (0 a 11 horas), intermediária (12 a 30 horas) e maturação (38 a 72 horas). A fase inicial é caracterizada pela adesão e desenvolvimento de blastósporos em microcolônias distintas. Na fase intermediária inicia-se a produção da matriz extracelular polimérica, onde pode ser identificada uma estrutura em bicamada, com presença de leveduras, tubos germinativos e algumas hifas. A fase de maturação é caracterizada pela presença de uma camada espessa de matriz, densa rede de hifas e leveduras (CHANDRA et al., 2001).

O biofilme propicia ao microrganismo alta capacidade de resistência à ação de agentes antifúngicos, conferida pela presença da matriz extracelular, impedindo a penetração do fármaco no interior do biofilme, limitando sua ação sobre as células fúngicas (NETT et al., 2011)

Como mencionado anteriormente, a candidíase pode ser decorrente de vários fatores predisponentes. No caso da candidíase oral, uma condição que favorece o seu desenvolvimento é o uso de prótese dentária total mal higienizada, que propicia a instalação de uma lesão conhecida como estomatite protética. Esta condição é bastante prevalente, com ocorrência em mais de 65 % dos usuários de prótese dentária total superior. Clinicamente, apresenta-se como áreas eritematosas na mucosa do palato, subjacente a superfície da prótese (WILLIAMS et al. 2011; WILLIAMS e DAVIS, 2011). A infecção ocorre após a formação do biofilme na superfície acrílica da prótese mal higienizada, especialmente na face que permanece em contato direto com a mucosa do palato. (PEREIRA-CENCI et al. 2010; WILLIAMS et al. 2011; TELES et al. 2012).

A infecção nesta região é protegida dos mecanismos de remoção do hospedeiro, devido ao baixo fluxo salivar na região afetada e pela formação do biofilme na superfície acrílica da

prótese, que não é removido pela descamação natural, como ocorre nas superfícies epiteliais (CAVALCANTI et al., 2015). Portanto, o uso de prótese dentária com higiene deficiente pode influenciar diretamente no surgimento e na severidade da estomatite protética, uma vez que propicia a adesão inicial da *Candida* aos tecidos e subsequente infecção (PEREIRA-CENCI et al., 2008; SILVA et al., 2010).

Considerando o aumento da resistência de espécies de *Candida* aos agentes antifúngicos (OLIVEIRA et al., 2006) e a necessidade em identificar métodos efetivos de higienização/desinfecção para a remoção diária do biofilme dental (SOUZA et al., 2009), torna-se fundamental a busca por terapias alternativas e/ou complementares, tendo crescido o interesse sobre as propriedades antimicrobianas de extratos vegetais, importantes para a Odontologia, podendo constituir alternativas viáveis e eficazes para prevenção e tratamento de doenças bucais (LIMA et al., 2014).

1.3 Mecanismos de ação dos antifúngicos em espécies de *Candida*

Fármacos antifúngicos são desenvolvidos e utilizados para o tratamento efetivo de infecções, tópicas ou sistêmicas, causadas por diferentes patógenos, como as espécies de *Candida* (KABIR E AHMAD, 2013). Em comparação aos fármacos antibacterianos disponíveis, a disponibilidade de agentes antifúngicos para o tratamento de infecções fúngicas é significativamente menor, principalmente pelo fato de que fungos são organismos eucarióticos, o que dificulta a identificação de fármacos que eliminem os patógenos, sem causar toxicidade às células do hospedeiro (TSUI et al., 2016).

O tratamento de eleição da candidíase baseia-se na localização anatômica da infecção, imunidade do paciente, espécie responsável pela infecção e susceptibilidade das espécies de *Candida* aos agentes antifúngicos. Em geral, os mecanismos de ação desempenhados por agentes antifúngicos estão relacionados à inibição da formação da parede celular, à ruptura da membrana celular e à inibição da divisão celular (HANI et al., 2015).

Os agentes antifúngicos, por sua vez, são classificados de acordo com alvo celular e com o modo de ação, existindo as seguintes classes de fármacos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas: azóis, polienos, equinocandinas, alilaminas e análogos da pirimidina (WILLIAMS E LEWIS, 2011; MATHE E VAN DIJCK, 2013).

Os antifúngicos poliênicos possuem espectro de ação superior à outras drogas antifúngicas, exibindo ação fungicida, ao contrário do azóis (MOEN et al., 2009). Os polienos mais comumente utilizados são a anfotericina B, a nistatina e a nitamicina (KABIR E

AHMAD, 2013). Essas drogas atuam por ligação direta ao ergosterol, induzindo o extravasamento de eletrólitos e do conteúdo citoplasmático da célula, através da formação de canais de íons transmembranares, provocando a morte da célula fúngica (AL-DHAHERI E DOUGLAS, 2010; WILLIAMS E LEWIS, 2011; MATHE E VAN DIJCK, 2013; HANI et al., 2015).

A anfotericina B possui interação intermolecular com o ergosterol, interagindo pobremente com a sua contraparte em mamíferos, o colesterol (MATSUMORI et al., 2009). Porém apesar de possuir ampla especificidade contra uma variedade de fungos patógenos, é considerada tóxica para células humanas, com risco de falência renal em pacientes que estão sobre seu tratamento (KABIR E AHMAD, 2013).

Os fármacos pertencentes à classe dos azóis constituem um dos grupos mais utilizados para o tratamento de infecções causadas por *Candida*. São classificados em imidazóis ou triazóis de acordo com a presença de dois ou três nitrogênios no anel azólico. Possuem ação biológica fungistática, com largo espectro contra fungos filamentosos e leveduras. Atuam na biossíntese do ergosterol (KABIR E AHMAD, 2013), esteroide encontrado na membrana celular do fungo essencial para a manutenção da integridade desta estrutura (TOLEDO et al., 2015). Os azóis como o fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol bloqueiam a enzima lanosterol 14- α -dimetilase e reduzem o nível de ergosterol necessário para a membrana celular (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006). Isto gera o acúmulo de precursores do ergosterol (lanosterol, dimetil zimosterol e metileno dihidrolanosterol), o que altera a estrutura e função da membrana celular, facilitando a penetração do fármaco no interior da célula (ABE et al., 2009).

O uso indiscriminado do fluconazol está associado ao aumento de linhagens resistentes, principalmente em pacientes portadores do vírus HIV, devido a alta prevalência de candidíase oral nesta população, alvo do tratamento profilático prolongado para a prevenção desta infecção (FIDEL, 2011). Novos azóis surgiram como opções terapêuticas, como o itraconazol, utilizado no tratamento da candidíase oral, e o voriconazol e posaconazol, utilizados para tratamento de infecções mais invasivas de *Candida* (TSUI et al., 2016).

As equinocandinas são compostos pertencentes à classe das lipoproteínas, com atividade fungicida sobre espécies de *Candida* (KABIR E AHMAD, 2013). Os fármacos desta classe mais utilizados são a caspofungina, micafungina e anidulafungina (PERLIN, 2011), que atuam inibindo a enzima β -1,3-glucana sintase, responsável pela síntese de β -glucano (KABIR E AHMAD, 2013). Como esta enzima está ausente nas células de mamíferos, os fármacos do tipo equinocandinas provocam pouca ou nenhuma toxicidade

sobre as células do hospedeiro (TSUI et al. 2016). No entanto, a utilização desta classe tem sido limitada devido ao tamanho maior de suas moléculas, exigindo a administração apenas por via intravenosa, e ao seu alto custo, sendo estes fármacos aplicados apenas em casos de infecção fúngica invasiva. (WILLIAMS E LEWIS, 2011)

Os fármacos pertencentes à classe das alilaminas, como a naftifina e a terbinafina, apresentam maior efetividade sobre linhagens de *Candida* resistentes aos agentes azólicos. Agem através do bloqueio da enzima squalene-epoxidase, alterando a biossíntese do ergosterol. As células tratadas com alilaminas apresentam acúmulo de squalene e consequente deficiência de ergosterol, alterando a permeabilidade da membrana celular. A naftifina possui propriedades anti-inflamatórias, atuando na redução da quimiotaxia de leucócitos e na produção de superóxido (KABIR E AHMAD, 2013). Porém, apesar de apresentar boa eficácia no tratamento antifúngico e aliviar sinais e sintomas inflamatórios, ocasiona efeitos adversos como ardor no local da aplicação (GUPTA et al., 2008).

Os análogos da pirimidina, como a flucitosina, atuam sobre as células de *Candida* através da enzima citosina permease, que uma vez no interior da célula, converte o fármaco em 5-fluoracil, metabólito tóxico para a célula fúngica, comprometendo a síntese de DNA e de proteínas, impedindo a divisão celular do patógeno (KABIR E AHMAD, 2013; MATHE E VAN DIJCK, 2013).

O uso de agentes antifúngicos clássicos, que atuam principalmente sobre a estrutura da parede ou membrana celular dos fungos, tem se deparado com o aumento do número de linhagens resistentes e com o surgimento de efeitos adversos (KRUPPA et al., 2003). Fatores como a rejeição de drogas pelas células fúngicas, a modificação dos alvos de ação através de mutações pontuais nos genes, a alteração de enzimas chaves nos processos de biossíntese e modulação de fatores de transcrição, desempenham um importante papel neste fenômeno (CANNON et al., 2009; MORSCHHÄUSER, 2010). Neste sentido, tem crescido o interesse pelo desenvolvimento de novas terapias que sejam eficazes no intuito de inibir a virulência dos patógenos e sua proliferação, além da possibilidade de serem aplicadas em terapias imunomoduladoras (CUI et al., 2016).

1.4 *Guapira graciliflora* Mart.

Dentre os biomas existentes no Brasil, destaca-se a caatinga, principal bioma do semiárido. É a quarta maior área coberta por uma vegetação única no país, correspondendo a cerca de 60% do território do nordeste (SILVA et al., 2012a). Existe um crescente interesse

no conhecimento desta área, cuja vegetação tem sido considerada rica para fins medicinais (ALBUQUERQUE et al., 2007; AGRA et al., 2007; ARAÚJO et al., 2008; CARTAXO et al., 2010; SIQUEIRA et al., 2012).

Dentre a biodiversidade disponível, destaca-se o uso medicinal da *Guapira graciliflora* Mart., planta pertencente à família Nyctaginaceae, encontrada comumente na caatinga, no semi-árido brasileiro. É bastante utilizada como planta medicinal pela população local (AGRA et al., 2008; SIQUEIRA et al., 2012), em função de suas atividades antituberculose, anti-inflamatória e cicatrizante (COELHO et al., 2005; PAVAN et al., 2009). É conhecida popularmente como João-mole, Maria-mole, Pau-mole, Pau-piranha, devido à baixa resistência de sua madeira (COELHO et al., 2005) (Figura 1).

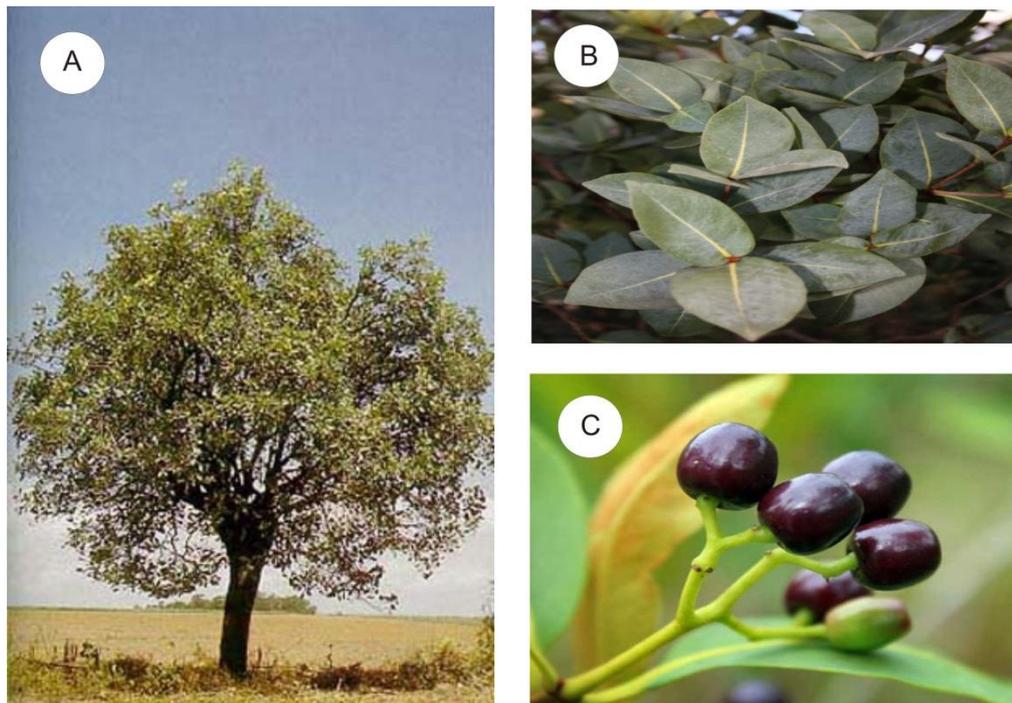


Figura 1: Visão geral da *G. graciliflora* (A), das suas folhas (B) e dos seus frutos (C).
(Fonte: www.google.com).

Estudos de avaliação do potencial antimicrobiano verificaram pelo método da microdiluição em caldo, que o extrato hidroalcolólico das folhas da *G. graciliflora* possui atividade contra *Klebsiella pneumoniae* (CIM = 512 µg/mL), *Enterococcus faecalis* (CIM = 12,50 µL/µL), *Staphylococcus aureus* (CIM = 12,50 µL/µL) e *Escherichia coli* (CIM = 12,50 µL/µL) (COSTA et al., 2010; ROCHA et al., 2013). Chaves et al. (2013) investigaram o potencial da *G. graciliflora* frente à diferentes espécies de bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus faecalis*) e espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*

e *C. guilliermondii*) também pelo método da microdiluição em caldo, e verificaram que nenhum dos microrganismos foi inibido pelas concentrações utilizadas do extrato das folhas da planta, coletadas no cariri paraibano, região do semiárido brasileiro, durante os meses de fevereiro (período de seca) e de agosto (período de chuva).

Em estudo preliminar, avaliamos o potencial antimicrobiano do extrato hidroalcolóico das folhas da *G. graciliflora*, bem como a sua toxidez frente às hemácias. Verificou-se que o extrato apresenta moderado potencial antifúngico frente à *C. albicans* (CIM = 250 µg/mL), com redução do número de células viáveis em biofilme monoespécie de *C. albicans*, de 48 horas, bem como baixa toxidez frente à hemácias nas concentrações até 16 mg/mL (ALVES, 2015, dados não publicados).

As folhas da *G. graciliflora* possuem metabólitos secundários, especialmente flavonoides, que conferem diferentes propriedades farmacológicas à planta, justificando o seu potencial biológico e a sua utilização pela medicina popular (COSTA et al., 2010; SEVERI et al., 2010; CHAVES et al., 2013). Esses compostos químicos liberados pelas plantas desempenham um papel essencial na defesa natural e no bem-estar dos vegetais. Estão distribuídos em diferentes classes fitoquímicas: terpenóides, óleos essenciais; alcaloides, polifenóis, flavonoides, taninos e cumarinas (GONÇALVES et al., 2005; BAGLA et al., 2014). Estudos a respeito da caracterização fitoquímica de plantas da família Nyctaginaceae revelam uma variedade de metabólitos secundários como flavonoides, carotenoides, betacianinas, alcaloides e saponinas (STINTZING et al., 2004; RINALDO et al., 2007; SEVERI et al., 2010; CHAVES et al., 2013).

Dentre esses compostos, destacam-se os flavonoides, pertencentes ao grupo dos polifenóis (BAGLA et al., 2014) e classificados em flavononas, flavonas, flavonóis e biflavonas (BEECHER et al., 2003). Esses compostos são investigados devido ao seu efeito neuroprotetor, efeito protetor contra danos ao DNA, atividade antiviral, atividade antimicrobiana, atividade anti-inflamatória, atividade antioxidante, entre outras (BAGLA et al., 2014).

A caracterização fitoquímica das espécies vegetais com determinação dos grupos de metabólitos secundários é considerada uma abordagem fundamental, visto que tais espécies dispõem de uma rica fonte de substâncias bioativas, que podem ser úteis no desenvolvimento de formulações terapêuticas (JEON et al., 2011).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* as atividades antifúngica, antibiofilme e antiproliferativa do extrato da *Guapira graciliflora* Mart.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar o perfil fitoquímico do extrato da *G. graciliflora* através de técnicas cromatográficas;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do extrato da *G. graciliflora* e de suas frações sobre espécies do gênero *Candida*;
- Verificar a capacidade do extrato da *G. graciliflora* em reduzir o número de unidades formadoras de colônia em biofilme de *Candida albicans*;
- Investigar o efeito do extrato da *G. graciliflora* sobre a atividade metabólica da *C. albicans* em biofilme;
- Analisar o potencial antiproliferativo do extrato da *G. graciliflora* e de suas frações sobre linhagens de células tumorais e não tumorais humanas;
- Verificar o efeito citotóxico do extrato da *G. graciliflora* sobre linhagens de macrófagos RAW 264.7.

3. METODOLOGIA

Trata-se de um estudo experimental *in vitro*, cuja sequência metodológica está representada no fluxograma abaixo:

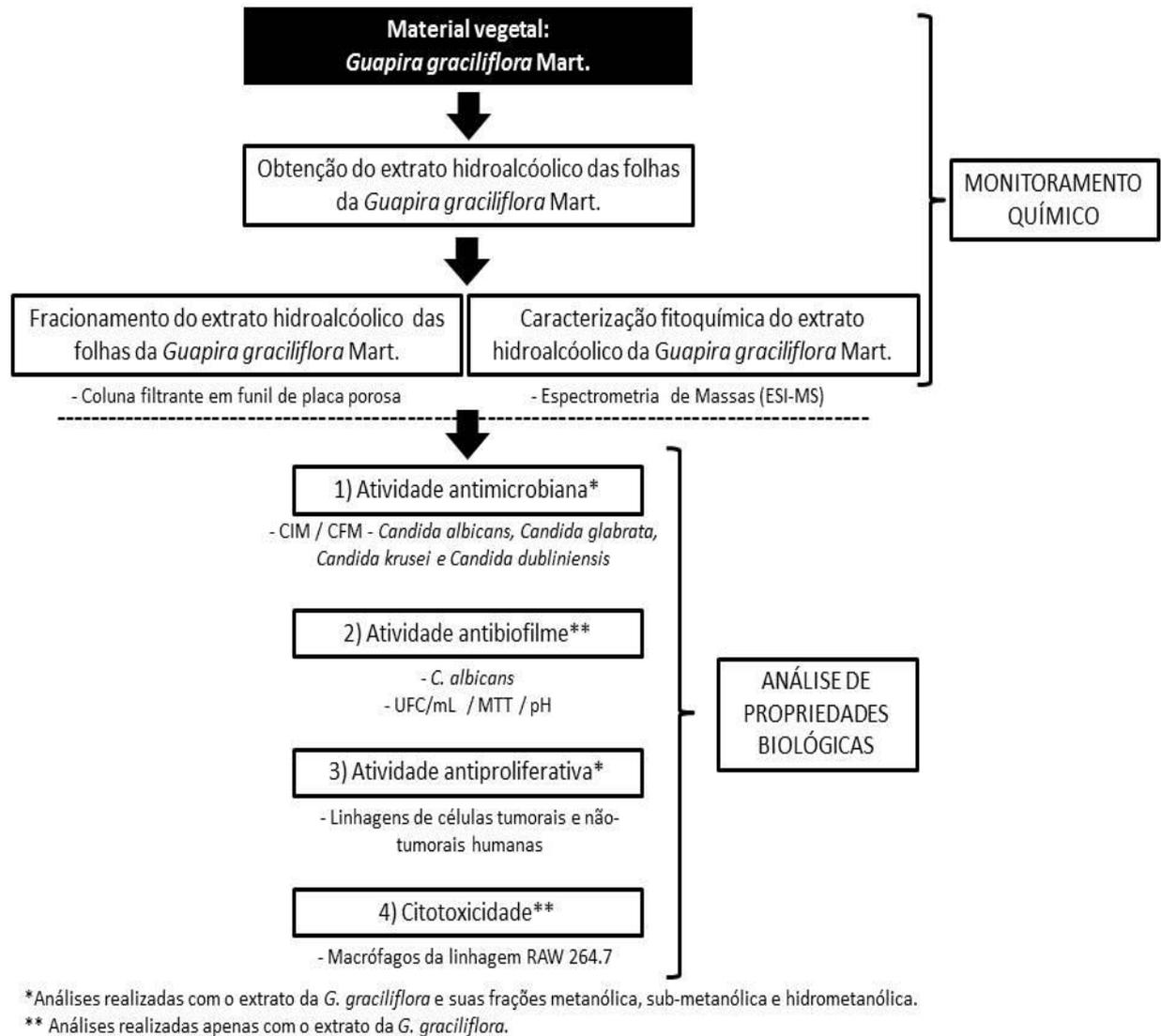


Figura 2: Sequência metodológica do estudo.

3.1 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado na Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande, Paraíba e no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA - UNICAMP) em Campinas, São Paulo. Este trabalho integra o projeto realizado em parceria com a Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP/UNICAMP), por meio do Convênio Federal Casadinho/Procad N° 552561/201108 do CNPq/MCT e Capes/MEC.

3.2 MATERIAL VEGETAL

As folhas da *Guapira Graciliflora* Mart. foram coletadas na região do semiárido paraibano, no município de Queimadas, na mesorregião da Borborema e microrregião 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 de peso constante. O material desidratado foi armazenado em saco de papel, em temperatura ambiente, até o momento da obtenção do extrato. O espécime testemunho da *G. Graciliflora* encontra-se 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.

3.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO

O extrato hidroalcoólico das folhas da *G. Graciliflora* foi obtido, através do processo de maceração, por cinco dias, em temperatura ambiente e protegido da luz, utilizando a proporção de 200 gramas da planta seca e moída para 1 litro do solvente (álcool etílico 50%) (CARVALHO et al., 2011). Após o processo de maceração, o álcool foi removido por evaporação à vácuo a 40°C (Quimis® / Q344 M) a 40° C, e a parte residual foi liofilizada (Labconco® / Freezone 4.5).

3.4 FRACIONAMENTO DO EXTRATO

3.4.1 Monitoramento inicial através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Os compostos químicos do extrato da *G. graciliflora* foram monitorados inicialmente por Cromatografia de Camada Delgada (CCD), utilizando-se cromatofolhas de alumínio com fase estacionária de sílica (TLC Silica gel 60 F₂₅₄ – Merck). Como fase móvel foi utilizada a mistura de acetato de etila (Synth®), ácido fórmico (Emsure®), ácido acético (Synth®) e água, nas proporções de 100:11:11:26, respectivamente. A marcação dos componentes químicos da amostra foi visualizada a olho nu e sob luz ultra-violeta (Solab® - 264 e 365 nm) e a cromatofolha revelada com anisaldeído, com posterior aquecimento a 100°C durante 1 minuto.

3.4.2 Fracionamento em coluna filtrante em funil de placa porosa

Realizou-se o fracionamento do extrato da *G. graciliflora* em coluna cromatográfica filtrante em funil de placa porosa com fase sólida de celulose (Cellulose microcrystalline - Merck®), através de partição sólido-líquido, de acordo com o gradiente de polaridade: hexano (2 x 100 mL); diclorometano (1 x 100 mL); diclorometano:metanol (1 x 100 mL - 95:5; 1 x 100 mL - 90:10; 1 x 100 mL - 50:50); metanol (1x 250 mL) e metanol:água (1 x 100 mL – 50:50). As 16 frações resultantes foram monitoradas por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e reunidas conforme o perfil de similaridade e colorações diante do revelador empregado e em seguida concentradas à vácuo (BUCHI Rotavapor® R-215). Após este procedimento, foram selecionadas as frações que continham os grupos de interesse para a avaliação das atividades biológicas: fração metanólica, subfração metanólica e fração hidrometanólica (50:50).

3.5 ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO POR MEIO DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR ELECTROSPRAY (ESI-MS)

O extrato (aproximadamente 10 mg) foi dissolvido em 1 mL do solvente mais apropriados e 10 µL de cada solução foi diluída em 990 µL de uma mistura de Metanol/H₂O (1:1, v/v) com 0,1 % de aditivos auxiliares, conforme método de ionização. Os aditivos auxiliares de favorecimento de ionização são ácido fórmico (99 %) ou hidróxido de amônio (25 %) utilizados para ESI (+) ou ESI (-), respectivamente, na concentração de 0,1 %. As soluções das amostras foram injetadas por inserção direta no espectrômetro de massas (7.2 T LTQ-FT Ultra, Thermo Scientific, Alemanha). O tempo total para aquisição de cada espectro foi fixado em 1 minuto. Os espectros de ESI-MS bem como os de ESI-MS/MS foram adquiridos nos modos negativo e positivo de ionização. Os espectros de *full scan* foram adquiridos na faixa de m/z 150 a 2000 e os espectros de ESI-MS/MS foram adquiridos a partir de m/z 50 até um valor pouco acima do íon em estudo e com energia de colisão de 10–40 eV. Os espectros foram tratados com o software específico do espectrômetro de massas (Xcalibur 2.0, Thermo Scientific, Alemanha).

3.6 CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO

Foi analisado o potencial antifúngico do extrato e das frações selecionadas por meio de ensaios *in vitro*, utilizando a técnica da microdiluição em caldo.

3.6.1 Microrganismos

Foram utilizadas linhagens de *Candida*: *C. albicans* ATCC 10231; *C. glabrata* CBS 07; *C. krusei* CBS 573 e *C. dubliniensis* CBS 7889.

3.6.2 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado seguindo as recomendações do protocolo M27-A3 para leveduras (CLSI, 2008). Culturas de leveduras de 24 horas foram adicionadas em 5 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9%), 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 desta suspensão, foram realizadas diluições seriadas em meio de cultura RPMI-1640, obtendo-se, ao final da mesma, uma densidade de $5,0 \times 10^3$ UFC/mL. Nos poços da microplaca, a solução final resultou em uma concentração de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

3.6.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método da Microdiluição em Caldo

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das amostras em teste foi realizada através da técnica da microdiluição em caldo, utilizando microplacas para microdiluição, contendo 96 poços. Inicialmente, foram depositados 100 µL/poço do meio de cultura RPMI-1640 (Angus Buffers & Biochemicals, Niagara Falls, NY, USA). Em seguida, acrescentou-se 100 µL/poço das amostras em teste, diluídas em meio de cultura RPMI-1640 e 10% de DMSO, no poço inicial numa concentração de 8 mg/mL. Procedeu-se a microdiluição, com a transferência de 100 µL do conteúdo do primeiro poço para o seguinte. Este procedimento foi repetido até o último poço com obtenção das concentrações entre 2000 e 0,4882 µg/mL das amostras em teste. Os 100 µL finais foram desprezados. Posteriormente, 100 µL da suspensão do microrganismo de 24 horas foram adicionados (5×10^3 UFC/mL). As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C. (CLSI 2008).

A nistatina (0,5 mg/mL) (Sigma-Aldrich®) foi utilizada como controle positivo. Foram analisados a esterilidade do meio de cultura e o controle de crescimento do microrganismo. Os ensaios foram realizados em duplicata, em dois experimentos diferentes.

Após o período de incubação, verificou-se alteração de coloração do meio RPMI-1640, de rosa (cor original) para amarelo, indicativo de mudança do potencial hidrogeniônico (pH), ocasionada pelo crescimento microbiano (CLSI, 2008).

Para classificação da atividade antimicrobiana do extrato e suas frações foram utilizados os parâmetros estabelecidos por Holetz et al (2002), considerando: CIM < 100 µg/mL - forte

atividade; CIM entre 100 e 500 µg/mL – atividade moderada; CIM entre 500 e 1000 µg/mL – fraca atividade e CIM > 1000 µg/mL – ausência de atividade.

3.6.4 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Para determinar a atividade fungicida, uma alíquota de 50 µL de cada poço, com concentrações igual e maiores que a CIM, foram subcultivadas em meio ágar sabouraud dextrose (Merck®) e incubadas a 37°C por 48 horas. As CFMs foram definidas como a menor concentração que inibiu o crescimento visível do microrganismo (CLSI, 2008).

3.7 CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL DE INIBIÇÃO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

3.7.1 Substrato de adesão de biofilme

Como substratos de adesão do biofilme, foram utilizados discos (10x10x5 mm) em resina acrílica incolor quimicamente polimerizada (Vipi Flash VIPI Produtos Odontológicos Ltda., Pirassununga, SP, Brasil). Os discos foram preparados de acordo com as instruções do fabricante (25°C, em proporções iguais de pó e líquido, sem incorporação de bolhas de ar) e em seguida foram imersos em água purificada a uma temperatura de 37°C por 24 horas para liberação de monômero residual. As superfícies dos discos foram submetidas a acabamento e polimento e em seguida desinfectados em água ultrapurificada e álcool etílico 70%, com o auxílio de equipamento de ultrassom, durante 20 minutos e armazenados em um tubo de vidro com água destilada para uso posterior (FREITAS-FERNANDES et al., 2014).

3.7.2 Preparo de inóculo

Uma cultura de *C. albicans* ATCC 10231 foi reativada em ágar sabouraud dextrose (Merck®) e incubada por 24 horas a 37°C. Em seguida, as células foram suspensas em sabouraud dextrose caldo (Himedia®). A concentração da suspensão microbiana foi determinada em câmara de Newbauer (KASVI®) com obtenção de uma densidade celular de 2×10^5 UFC/mL.

3.7.3 Análise de inibição de aderência do biofilme

Inicialmente, cada disco de resina foi colocado em poço individual de uma placa de cultura de células de 24 poços (KASVI® 24 well Tissue Culture Plate), contendo 1 mL da suspensão de *C. albicans* (1×10^5 UFC/mL) e 1 mL do extrato vegetal diluído em meio de

cultura, suplementando com 1% de glicose, nas seguintes concentrações: 62,5 µg/mL, 125 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL. As placas foram incubadas por 2 horas a 37°C (LABOR® SP-200). Como controle positivo utilizou-se nistatina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich®).

Após o período de 2 horas, os discos foram transferidos para novas placas de 24 poços (KASVI® 24 well Tissue Culture Plate) contendo 2 mL/poço de meio de cultura sabouraud dextrose caldo (Himedia®) suplementado com 1% de glicose, e incubados por 24 e 48 horas a 37°C. No biofilme de 48 horas, procedeu-se a troca do meio de cultura em 24 horas. Após cada período, os discos foram lavados com solução salina de NaCl a 0,9% e transferidos para tubos contendo 2 mL de solução salina de NaCl a 0,9%. O biofilme foi removido dos discos com auxílio de agitador de tubos (KASVI®, Vortex Mixer K45-2810), por 30 segundos, obtendo-se uma suspensão do biofilme. Esta suspensão foi utilizada para quantificação de células viáveis (UFC/mL) e avaliação da atividade metabólica da *C. albicans*. O ensaio foi realizado em quadruplicata.

3.7.4 Quantificação de células viáveis do biofilme

Para quantificação das células viáveis, a suspensão do biofilme passou por diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}) e uma alíquota de 10 µL de cada diluição foi plaqueada em triplicata em meio ágar sabouraud dextrose (Himedia®). As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após esse período, as unidades formadoras de colônia foram contadas e os resultados expressos em UFC/mL (FREITAS-FERNANDES et al., 2014).

3.7.5 Avaliação da atividade metabólica (Ensaio do MTT)

A viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT (brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich® - Brometo Tiazolil Azul de Tetrazólio). Um mililitro da suspensão contendo as células do biofilme residual foi centrifugada (KASVI®, K14-0602) a 1500 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionado ao pellet 200 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL). A suspensão foi incubada por 3 horas a 37°C. Após este período, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados às células 200 µL de álcool isopropílico. As células foram novamente incubadas a 37°C, por 15 minutos sob agitação orbital. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas (Biochrom®, EZ Reader 400 Microplate Reader), com comprimento de onda de 570 nm (OLIVEIRA et al., 2014).

3.7.6 Avaliação do potencial hidrogeniônico (pH)

O pH do meio de cultivo do biofilme foi mensurado após os períodos de incubação, 24 e 48 horas, utilizando pHmetro (BEL Engineering, W3B pH meter).

3.8 CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO EM CULTURA DE CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS

As linhagens utilizadas no estudo foram cedidas pelo National Cancer Institute (NCI), Frederick, Maryland, EUA. As linhagens celulares utilizadas na avaliação da atividade antiproliferativa (Tabela 1), foram cultivadas em frascos com 5 mL de meio RPMI-1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco® -BRL, Grand Island, NY, USA) a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ (Forma Scientific®, CO₂ Water Jacketed Incubator), durante 24 horas.

Tabela 1. Linhagens de células tumorais e não tumoral humanas utilizadas nos testes de avaliação da atividade antiproliferativa.

TIPO CELULAR	LINHAGEM	ORIGEM
Glioma	U251	Tumoral
Mama	MCF-7	Tumoral
Ovário resistente	NCI-ADR/RES	Tumoral
Rim	786-0	Tumoral
Pulmão	NCI-H460	Tumoral
Próstata	PC-3	Tumoral
Cólon	HT-29	Tumoral
Queratinócito	HaCat	Não tumoral

Foram preparadas suspensões celulares, para cada linhagem, com meio RPMI-1640 acrescido de 5% de SFB e 1% de penicilina:estreptomicina, e ajustadas em suas respectivas densidades de inoculação. Em placas de 96 poços, foram inseridos 100 µL da suspensão celular, sendo as placas posteriormente incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. Foi também preparada uma placa controle (placa T₀), com todas as linhagens celulares utilizadas no experimento.

As amostras (extrato da *G. graciliflora* e frações) foram diluídas em dimetilsulfóxido de sódio (DMSO) (Merck®) na concentração de 0,1 g/mL. A concentração final de DMSO não afetou a viabilidade celular. Em seguida, foram adicionados 100 µL de cada amostra, em triplicata, nos poços iniciais e procedeu-se à diluição seriada, resultando em concentrações das amostras de 0,25 µg/mL; 2,5 µg/mL; 25 µg/mL e 250 µg/mL, (Placa T). As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Como controle positivo foi utilizado o quimioterápico doxorrubicina, nas concentrações de 0,25 µg/mL; 2,5 µg/mL; 25 µg/mL e 250 µg/mL, (100 µL por poço) em triplicata.

No momento da adição das amostras, as células inoculadas na placa T₀ foram fixadas com a adição de 50 µL por poço de ácido tricloroacético (TCA) (Sigma®) a 50%, para a determinação da quantidade de células presentes no momento em que as amostras foram aplicadas. O TCA atua como fixador, precipitando proteínas. Células viáveis se mantêm fixas na placa, enquanto células não viáveis se desprendem, sendo lavadas.

Após 48 horas de tratamento, as células tratadas foram fixadas com TCA a 50% e incubadas por 1 hora. Em seguida, as placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água corrente, para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários, e foram mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa. Após a secagem, foram adicionados 50 µL por poço do corante proteico Sulforrodamina B (SRB) (Sigma®) a 0,4% dissolvido em ácido acético a 1%. A SRB é um corante proteico que se liga aos aminoácidos básicos das proteínas de células que estavam viáveis no momento da fixação. Por isso, quanto maior a quantidade de SRB ligada à proteína, menor a atividade citotóxica da amostra em teste (SKEHAN et al., 1990). Em seguida as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos. Após este período, as placas foram lavadas por 4 vezes consecutivas com solução de ácido acético a 1%, para remover o corante não ligado às células, e após a secagem completa à temperatura ambiente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 150 µL por poço de solução de Trizma Base (10 µM, pH 10,5) (Sigma®). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em leitor de microplacas (Molecular Devices®, modelo VersaMax) a 540 nm.

A porcentagem de inibição do crescimento de cada amostra testada foi calculada pelas seguintes equações: $100 \times [(T-T_0) / (C-T_0)]$, quando $T_0 < T \leq C$, e $100 \times [(T-T_0) / (T_0)]$, quando $T \leq T_0$, onde T equivale a média das absorbâncias das células tratadas, C ao controle de células e T₀ ao controle das células no dia da adição das amostras.

Utilizando a curva de concentração-resposta para cada linhagem celular, a GI₅₀ (concentração necessária da amostra para que ocorra 50% de inibição de crescimento) foi

determinada por meio de análise de regressão não-linear, através do software Origin 8.0 (OriginLab Corporation) (MONKS et al., 1991; SHOEMAKER, 2006).

3.9 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CULTURA DE CÉLULAS DE MACRÓFAGOS RAW 264.7

Foi preparada uma suspensão de células da linhagem de macrófagos RAW 264.7 (ATTC, Manassa, VA, USA) em meio RPMI com 5% de SFB e penicilina-estreptomicina (2mg/L), ajustada em sua respectiva densidade de inoculação (1×10^5 células/mL). Foram aplicados 100 μ L da suspensão em cada poço das placas de 96 poços, que foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Foi preparada também uma placa controle (placa T₀).

A amostra do extrato bruto da *G. graciliflora* foi diluída em dimetilsulfóxido de sódio (DMSO) (Merck®) resultando na concentração de 0,1 g/mL. A concentração final de DMSO não afetou a viabilidade celular. Em seguida, 100 μ L da amostra foram adicionados, em quadruplicata, nos poços iniciais. Procedeu-se a diluição seriada, resultando nas concentrações de 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81; 3,91; 1,95; 0,98; 0,49 e 0,24 μ g/mL, (Placa T). As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂.

No momento da adição das amostras, as células inoculadas na placa T₀ foram fixadas com a adição de 50 μ L por poço de ácido tricloroacético (TCA) (Sigma®) a 50%, para a determinação da quantidade de células presentes no momento em que as amostras foram aplicadas.

Após 48 horas de tratamento, as células tratadas foram fixadas com TCA a 50% e incubadas por 1 hora. Em seguida, as placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água corrente, para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários, e foram mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa. Após a secagem, foram adicionados 50 μ L por poço do corante protéico Sulforrodamina B (SRB) (Sigma®) a 0,4% dissolvido em ácido acético a 1%. Em seguida as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos. Após este período, as placas foram lavadas por 4 vezes consecutivas com solução de ácido acético a 1%, para remover o corante não ligado às células, e após a secagem completa à temperatura ambiente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 150 μ L por poço de solução de Trizma Base (10 μ M, pH 10,5) (Sigma®). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em leitor de microplacas (Molecular Devices®, modelo VersaMax) a 540 nm.

A viabilidade celular foi calculada através da seguinte equação: Viabilidade celular (%) = $(A_{\text{amostra}}/A_{\text{controle}}) \times 100\%$, onde A_{amostra} e A_{controle} equivalem às absorbâncias das amostras com e sem a adição do tratamento, respectivamente.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados da atividade antibiofilme e da citotoxicidade sobre macrófagos foram tabulados e analisados estatisticamente no programa *Statistical Package for Social Sciences* v. 20 (SPSS Statistics, v. 20, IMB, Chicago, IL). Inicialmente, os dados foram avaliados quanto a sua distribuição, utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, utilizou-se a análise de variância a um critério fixo (ANOVA one-way) e análise post-hoc pelo teste de Tukey. Os produtos testados foram considerados como fator de estudo e o nível de significância foi estabelecido em 5% ($\alpha < 0,05$).

4. RESULTADOS

ATIVIDADES ANTIFÚNGICA, ANTIBIOFILME E ANTIPROLIFERATIVA DA *Guapira graciliflora* Mart.

RESUMO

Relevância etnofarmacológica: A *Guapira graciliflora* Mart. é uma planta pertencente à família Nyctaginaceae, bastante utilizada pela população no nordeste brasileiro, em função de suas atividades anti-inflamatória e cicatrizante.

Objetivo do estudo: O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* as atividades antifúngica, antibiofilme e antiproliferativa do extrato das folhas da *G. graciliflora*.

Materiais e métodos: O extrato foi obtido pelo processo de maceração e posteriormente concentrado a vácuo e liofilizado. As frações foram obtidas através de coluna filtrante em funil de placa porosa. A caracterização fitoquímica do extrato foi realizada por Espectrometria de Massas com ionização por eletrospray (ESI-MS). A atividade antimicrobiana do extrato e de suas frações foi avaliada pela técnica da microdiluição em caldo frente à espécies de *Candida*. A inibição do biofilme de *C. albicans* foi avaliada considerando o número de UFC/mL, a atividade metabólica (MTT) e o pH. A atividade antiproliferativa do extrato e de suas frações foi avaliada sobre linhagens de células tumorais e não tumorais humanas, e a citotoxicidade do extrato foi verificada sobre a linhagem de macrófagos RAW 264.7, ambas pelo método da Sulforrodamina B.

Resultados: A caracterização fitoquímica indicou a presença sugestiva dos flavonoides rutina e kaempferol. O extrato e a fração metanólica exibiram moderada atividade antifúngica sobre *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata* e forte atividade sobre *C. dubliniensis*. Nas concentrações de 125 e 62 µg/mL ($p < 0,05$), o extrato reduziu em maior quantidade o número de UFC/mL (34,1% e 36,9%, respectivamente) de *C. albicans* no biofilme de 24 horas. A concentração de 250 µg/mL foi a mais efetiva ($p < 0,05$) em diminuir a atividade metabólica (50,79%) das células de *C. albicans*, no biofilme de 48 horas. Os valores de pH observados nos biofilmes tratados com o extrato foram maiores do que naqueles sem tratamento. O extrato e suas frações não apresentaram efeito antiproliferativo sobre as linhagens tumorais testadas, com médias de atividade ($\log GI_{50}$) igual ou maior que 1,71 µg/mL. A viabilidade celular dos macrófagos foi mantida acima de 80% para concentrações do extrato até 62,5 µg/mL.

Conclusões: O extrato da *G. graciliflora* possui flavonoides em sua composição química. Apresenta potenciais antifúngico e antibiofilme, sem evidências de atividade antiproliferativa significativa sobre linhagens de células tumorais e não tumorais humanas.

Palavras-chaves: Plantas medicinais. Produtos com ação antimicrobiana. Biofilme. Ensaio de seleção de medicamentos antitumorais. Citotoxicidade.

1. Introdução

A candidíase oral é uma micose mucocutânea causada por leveduras do gênero *Candida*, especialmente, pela *Candida albicans* (Coronado-Castellote e Jiménez-Soriano, 2013). Espécies de *Candida* estão normalmente presentes na microbiota da cavidade oral e sua transição para a forma patogênica ocorre quando seus fatores de virulência predominam em relação aos mecanismos de defesa do hospedeiro, desencadeando a infecção (Ferreira et al., 2015). Os fatores predisponentes para a candidíase oral incluem doenças sistêmicas, imunodeficiências, terapia antibiótica de largo espectro, redução do fluxo salivar, uso noturno contínuo de próteses orais mal higienizadas e tabagismo (Pinelli et al., 2013).

A incidência da candidíase nas últimas décadas gerou impacto negativo na saúde pública. Isto pode ter sido decorrente do crescente número de pacientes imunocomprometidos, da ampla utilização de antibióticos de largo espectro e do aumento da prevalência de candidíase causada por espécies não-*albicans*, como *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*. Essas espécies não-*albicans* estão intimamente relacionadas a um maior índice de mortalidade e resistência antifúngica do que a *C. albicans* (Pfaller et al., 2011; Silva et al., 2012c; Sardi et al., 2013).

Os antifúngicos disponíveis no mercado apresentam eficácia, no entanto, podem produzir efeitos adversos, como reações alérgicas e interações medicamentosas (Bakhshi et al., 2012). Além disso, observa-se o surgimento de cepas resistentes, o que tem induzido à instalação de infecções sérias e persistentes. Nesse sentido, fatores de investigação convergem para a busca por alternativas terapêuticas, eficientes no controle microbiológico para uso em seres humanos (Tsang et al., 2007; Bansod e Rai, 2008; Oliveira et al., 2013).

Surge assim, o interesse para o desenvolvimento de pesquisas com plantas medicinais. Em função dos seus potenciais terapêuticos para o desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes e com menos efeitos indesejáveis do que os já existentes, estas fontes podem fornecer aos profissionais de saúde uma opção de terapia viável para o tratamento de doenças orais

(Ferreira et al., 2015). Tal condição motiva a investigação química de plantas medicinais utilizadas pela população, o que propicia a descoberta de compostos isolados com potencial terapêutico (Silva et al., 2012b).

Dentre a biodiversidade estudada, destaca-se o uso medicinal da *Guapira graciliflora* Mart., pertencente à família Nyctaginaceae, comumente encontrada na caatinga, no semi-árido brasileiro, e bastante utilizada como planta medicinal pela população local (Agra et al., 2008), em função de suas atividades antituberculose, anti-inflamatória e cicatrizante (Coelho et al., 2005; Pavan et al., 2009). É conhecida popularmente como João-mole, Maria-mole, Pau-mole, Pau-piranha, devido à baixa resistência de sua madeira (Coelho et al., 2005).

Este estudo avaliou *in vitro* as atividades antifúngica, antibiofilme e antiproliferativa do extrato das folhas da *G. graciliflora* Mart.

2. Materiais e métodos

2.1 Preparação do extrato e Fracionamento

As folhas da *Guapira graciliflora* Mart. foram coletadas no mês de agosto no município de Queimadas, região do semiárido paraibano, mesorregião da Borborema e microrregião do Cariri Oriental. O espécime testemunho da *G. Graciliflora* encontra-se 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. As folhas (200 g) foram secas, moídas e imersas em etanol a 50% (1 L) por 48 horas. Após esse período, a mistura foi filtrada e os resíduos novamente imersos em etanol a 50% por mais duas vezes. As três fases finais foram concentradas a vácuo (Quimis® / Q344 M) e liofilizadas (Labconco® / Freezezone 4.5). Os compostos químicos do extrato foram monitorados inicialmente por Cromatografia de Camada Delgada (CCD), utilizando-se cromatofolhas de alumínio com fase estacionária de sílica (TLC Silica gel 60 F₂₅₄ – Merck) e fase móvel de acetato de etila: ácido fórmico:ácido acético:água (100:11:11:26). A marcação dos componentes químicos da amostra foi visualizada a olho nu e sob luz ultra-violeta (264 e 365 nm) e a cromatofolha revelada com anisaldeído, com posterior aquecimento a 100°C durante 1 minuto. Para o fracionamento do extrato, foi realizada partição sólido-líquido, em coluna cromatográfica filtrante em funil de placa porosa, de acordo com gradiente de polaridade: hexano, diclorometano, diclorometano:metanol (95:5, 90:10, 50:50), metanol e metanol:água (50:50). As frações resultantes foram monitoradas por CCD e reunidas conforme o perfil de

similaridade e colorações diante do revelador empregado e em seguida concentradas a vácuo (BUCHI Rotavapor® R-215).

2.2 Caracterização fitoquímica

A análise fitoquímica do extrato foi realizada por Espectrometria de Massas com ionização por eletrospray (ESI-MS). O extrato (10 mg) foi dissolvido em 1 mL do solvente apropriado e 10 µL da solução resultante foi diluída em 990 µL de uma mistura de Metanol/H₂O (1:1, v/v) com 0,1 % de aditivos auxiliares, conforme método de ionização. Os aditivos auxiliares de favorecimento de ionização são ácido fórmico (99 %) ou hidróxido de amônio (25 %) utilizados para ESI (+) ou ESI (-), respectivamente, na concentração de 0,1 %. As soluções das amostras foram injetadas por inserção direta no espectrômetro de massas (7.2 T LTQ-FT Ultra, Thermo Scientific, Alemanha). O tempo total para aquisição de cada espectro foi fixado em 1 minuto. Os espectros ESI-MS bem como os de ESI-MS/MS foram adquiridos no modo negativo de ionização. Os espectros de *full scan* foram adquiridos na faixa de *m/z* 150 a 2000 e os espectros de ESI-MS/MS foram adquiridos a partir de *m/z* 50 até um valor pouco acima do íon em estudo e com energia de colisão de 10–40 eV. Os espectros foram tratados com o software específico do espectômetro de massas (Xcalibur 2.0, Thermo Scientific, Alemanha).

2.2 Atividade antifúngica

Foi analisado o potencial antimicrobiano do extrato e das frações selecionadas frente às linhagens de espécies de *Candida*: *C. albicans* ATCC 10231; *C. glabrata* CBS 07; *C. krusei* CBS 573 e *C. dubliniensis* CBS 7889, por meio da técnica da microdiluição em caldo, com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) de acordo com as normas estabelecidas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (2008). O extrato e as frações da *G. graciliflora* foram diluídas em meio de cultura RPMI-1640 (Angus Buffers & Biochemicals, Niagara Falls, NY, USA) e 10% de DMSO (Dimetilsufóxido) (Sigma-Aldrich®). O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços contendo 100 µL/poço de meio de cultura RPMI-1640. Acrescentou-se 100 µL/poço das amostras em teste no poço inicial (8 mg/mL) e procedeu-se a microdiluição seriada, obtendo-se concentrações entre 2000 e 0,4882 µg/mL. Em seguida, acrescentou-se 100 µL da suspensão das leveduras (5×10^3 UFC/mL) em cada poço. As placas foram incubadas por 48

horas a 37°C. A Nistatina (0,5 mg/mL) (Sigma-Aldrich®) foi utilizada como controle positivo. A CIM foi definida como a menor concentração das amostras capaz de inibir o crescimento microbiano visível, confirmado pela mudança de coloração do meio RPMI-1640.

Para classificação da atividade antimicrobiana do extrato e suas frações foram utilizados os parâmetros estabelecidos por Holetz et al (2002), considerando: CIM < 100 µg/mL - forte atividade; CIM entre 100 e 500 µg/mL – atividade moderada; CIM entre 500 e 1000 µg/mL – fraca atividade e CIM > 1000 µg/mL – ausência de atividade.

Para determinar a CFM, uma alíquota de 50 µL de cada poço, com concentrações igual e maiores que a CIM, foi subcultivada em meio ágar sabouraud dextrose (Merck®) e incubada a 37°C por 48 horas. As CFMs foram definidas como a menor concentração que inibiu crescimento visível. Os ensaios foram realizados em duplicata, em dois experimentos diferentes.

2.3 Inibição de formação do biofilme

Discos de resina acrílica incolor quimicamente polimerizada foram colocados de forma individualizada em poços de placa de 24 poços (KASVI® 24 well Tissue Culture Plate), contendo 1 mL da suspensão de *C. albicans* (2×10^5 UFC/mL) e 1 mL do extrato diluído em meio de cultura sabouraud dextrose caldo (Himedia®), suplementado com 1% de glicose, obtendo-se as seguintes concentrações do extrato: 62,5 µg/mL, 125 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL. As placas foram incubadas por 2 horas a 37°C (LABOR® SP-200), em agitador orbital. A Nistatina a 100 µg/mL (Sigma-Aldrich®) foi utilizada como controle positivo. Após este período, os discos foram transferidos para nova placa de 24 poços (KASVI® 24 well Tissue Culture Plate) contendo 2 mL/poço de meio de cultura sabouraud dextrose caldo (Himedia®) suplementando com 1% de glicose e incubados por 24 e 48 horas, sob 37°C. Após cada período, os discos foram lavados em solução salina de NaCl a 0,9% e transferidos para tubos contendo 2 mL de nova solução salina de NaCl a 0,9%, em que o biofilme foi removido dos discos em agitador de tubos (KASVI®, Vortex Mixer K45-2810) por 30 segundos, obtendo-se uma suspensão do biofilme. Esta suspensão foi utilizada para quantificação de células viáveis (UFC/mL) e avaliação da atividade metabólica da *C. albicans*. O ensaio foi realizado em quadruplicata (Freitas-Fernandes et al., 2014).

2.4.1 Quantificação de células viáveis

A suspensão do biofilme passou por diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}) e uma alíquota de 10 μ L de cada diluição foi plaqueada em triplicata em meio ágar sabouraud dextrose (Himedia®). As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas (LABOR® SP-200). Após o período de incubação, as unidades formadoras de colônia foram contadas e os resultados expressos em UFC/mL (Freitas-Fernandes et al., 2014).

2.4.2 Atividade metabólica

A atividade metabólica das células foi determinada pelo método do MTT (brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich® - Brometo Tiazolil Azul de Tetrazólio). Um volume de 1 mL da solução contendo as células do biofilme residual foi centrifugado (KASVI®, K14-0602) a 1500 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado ao pellet 200 μ L de solução de MTT com concentração de 0,5 mg/mL. As células foram incubadas por 3 horas a 37°C (LABOR® SP-200). Após este período, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados às células 200 μ L de álcool isopropílico. As células foram novamente incubadas a 37°C, por 15 minutos sob agitador orbital. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas (Biochrom®, EZ Reader 400 Microplate Reader), com comprimento de onda de 570 nm (Oliveira et al., 2014a).

2.4.3 Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH do meio de cultivo dos biofilmes de *C. albicans*, foi mensurado após os períodos de incubação, 24 e 48 horas, em pHmetro (BEL Engineering, W3B pH meter).

2.4 Ensaio antiproliferativo

A atividade antiproliferativa do extrato da *G. graciliflora* e de suas frações foram avaliadas sobre as linhagens de células tumorais humanas U251 (glioma), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário resistente), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), HT-29 (cólon) e a linhagem não tumoral HaCat (queratinócito). Foram preparadas suspensões celulares em meio RPMI-1640 acrescido de 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA), 1% de penicilina: estreptomicina. As suspensões, ajustadas em suas respectivas densidades, foram inseridas em placas de 96 poços (100 μ l/poço) e expostas ao extrato e às frações (0,25 μ g/mL; 2,5 μ g/mL; 25 μ g/mL e 250 μ g/mL), diluídos em

dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), permanecendo por 48 horas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ (Forma Scientific®, CO₂ Water Jacketed Incubator). Antes (placa T₀) e após a adição das amostras (placa T), as células foram fixadas com ácido tricloroacético (TCA) (Sigma®) a 50%. A proliferação celular foi determinada pela quantificação espectrofotométrica (540 nm) do teor de proteínas, utilizando Sulforrodamina B (SRB) (Sigma®). O quimioterápico Doxorubicina (0,1 mg/mg) foi utilizado como controle positivo. Através da curva concentração-resposta para cada linhagem celular, a GI₅₀ (concentração necessária da amostra para que ocorra 50% de inibição de crescimento) foi determinada por meio de análise de regressão não-linear, usando software Origin 8.0 (OriginLab Corporation) (Monks et al., 1991; Shoemaker, 2006).

2.6 Ensaio de citotoxicidade

Foi preparada uma suspensão de células da linhagem de macrófagos RAW 264.7 (ATTC, Manassa, VA, USA) em meio RPMI-1640 (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA), 5% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina:estreptomicina. As suspensões foram inseridas em placas de 96 poços (100 µl/poço) e expostas ao extrato (125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 31,25 µg/mL; 15,63 µg/mL; 7,81 µg/mL; 3,91 µg/mL; 1,95 µg/mL; 0,98 µg/mL; 0,49 µg/mL e 0,24 µg/mL), diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), na concentração de 0,1 g/mL permanecendo por 48 horas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ (Forma Scientific®, CO₂ Water Jacketed Incubator). Antes (placa T₀) e após a adição das amostras (placa T), as células foram fixadas com ácido tricloroacético (TCA) (Sigma®) a 50%. A proliferação celular foi determinada pela quantificação espectrofotométrica (540 nm) do teor de proteínas, utilizando Sulforrodamina B (SRB) (Sigma®). A viabilidade celular foi calculada através da seguinte equação: viabilidade celular (%) = $(A_{\text{amostra}}/A_{\text{controle}}) \times 100\%$, onde A_{amostra} e A_{controle} equivalem às absorbâncias das amostras com e sem a adição do tratamento, respectivamente.

2.7 Análise estatística

Os dados da atividade antibiofilme e da citotoxicidade sobre macrófagos foram tabulados e analisados estatisticamente no programa *Statistical Package for Social Sciences* v. 20 (SPSS Statistics, v. 20, IMB, Chicago, IL). Inicialmente, os dados foram avaliados quanto a sua distribuição, utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, utilizou-se a

análise de variância a um critério fixo (ANOVA one-way) e análise post-hoc pelo teste de Tukey. Os produtos testados foram considerados como fator de estudo e o nível de significância foi estabelecido em 5% ($\alpha < 0,05$).

3. Resultados

3.1 Caracterização fitoquímica

O espectro ESI(-)-MS do extrato da *G. graciliflora* (Fig. 1) exhibe a presença dos íons referentes às moléculas desprotonadas $[M - H]^-$ m/z 193, de fórmula molecular compatível à $C_7H_{14}O_6$, sugerindo a presença do 3-O-metil-*chiro*-inositol (pinitol); m/z 593, de fórmula molecular compatível à $C_{27}H_{29}O_{15}$, sugerindo a presença do kaempferol-3-*O*- β -D-glicopiranosil-(6'' \rightarrow 1''')-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo; além do íon m/z 609, de fórmula molecular compatível à $C_{27}H_{29}O_{16}$, sugerindo a presença da quercetina-3-*O*- β -D-glicopiranosil-(6'' \rightarrow 1''')-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (rutina). Os espectros de ESI-MS/MS para cada íon estão representados nas Figuras 2, 3 e 4.

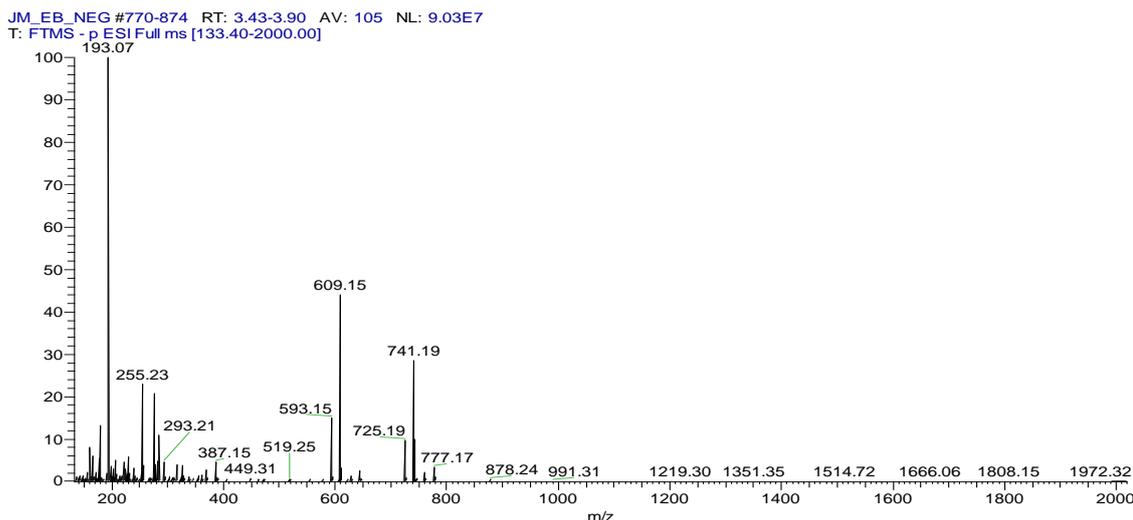


Fig. 1. Espectro ESI(-) -MS obtido do extrato das folhas da *G. graciliflora*.

JM_EB_NEG_193 #2-13 RT: 0.01-0.06 AV: 12 NL: 4.58E6
T: FTMS - p ESI Full ms2 193.00@hcd35.00 [50.00]

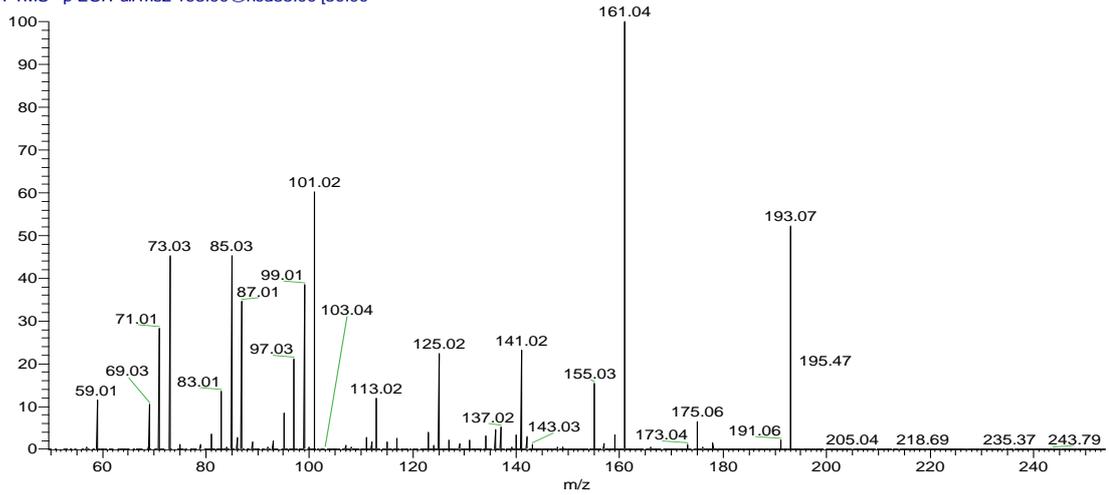


Fig. 2. Espectro ESI(-)-MS/MS obtido para o íon de m/z 193.

JM_EB_NEG_593 #44-51 RT: 0.20-0.23 AV: 8 NL: 4.34E6
T: FTMS - p ESI Full ms2 593.00@hcd30.00 [50.00]

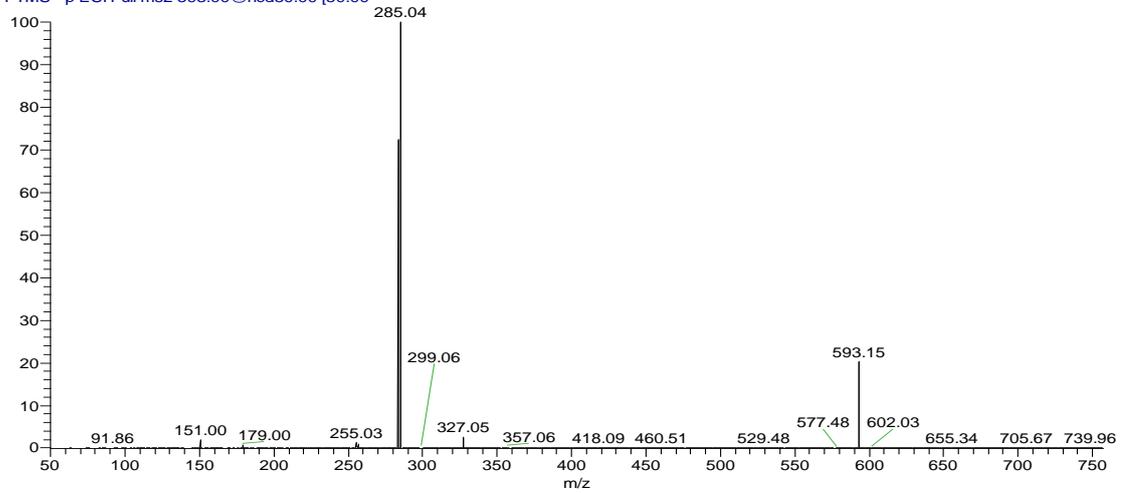


Fig. 3. Espectro ESI(-)-MS/MS obtido para o íon de m/z 593.

JM_EB_NEG_609 #62-131 RT: 0.28-0.59 AV: 70 NL: 8.63E6
T: FTMS - p ESI Full ms2 609.00@hcd25.00 [50.00]

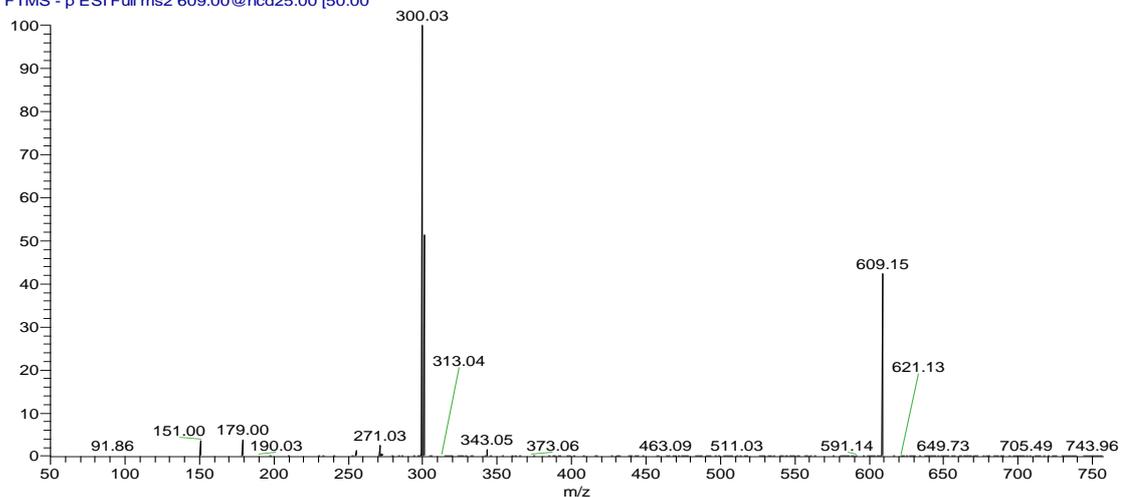


Fig. 4. Espectro ESI(-)-MS/MS obtido para o íon de m/z 609.

Com o espectro do íon de m/z 1351 (Fig. 5), pode-se inferir que há a presença marcante de rutina (m/z 609), pois os íons principalmente fragmentados do espectro são os íons de m/z 609 e 741. Portanto, o íon de m/z 1351 é um dímero assimétrico desprotonado da rutina e do íon de m/z 741, este último ainda não foi identificado.

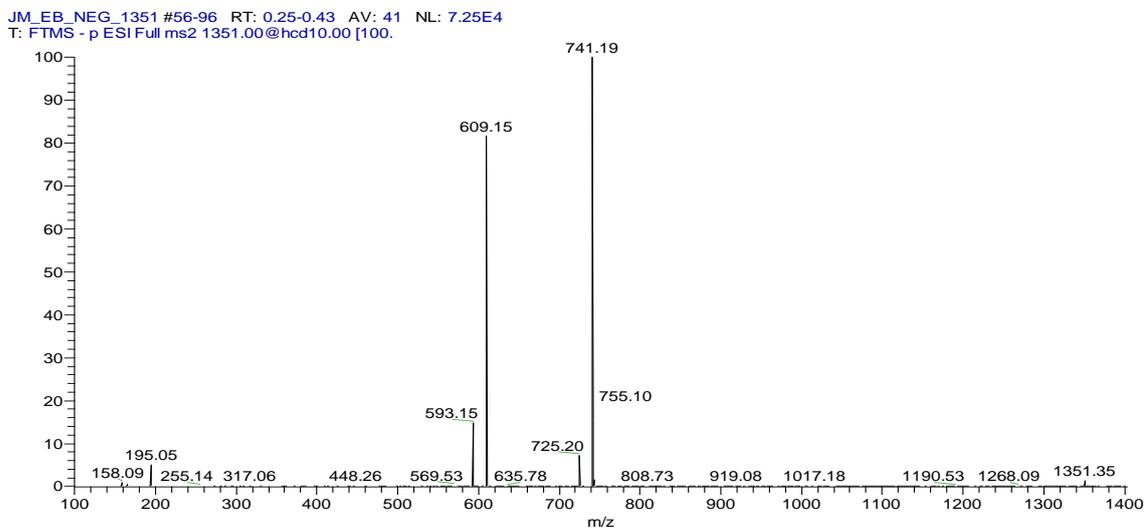


Fig. 5: Espectro ESI(-)-MS/MS obtido para o íon de m/z 1351.

A Tabela 1 mostra a identificação das moléculas propostas com base nos espectros de ESI(-)-MS/MS e os dados de massa de alta resolução obtidos para o extrato bruto da *G. graciliflora*.

Tabela 1: Proposta de identificação das moléculas e os dados de massa obtidos para o extrato bruto da *G. graciliflora*.

COMPOSTO	[M - H] ⁻			ERRO (ppm)
	FÓRMULA MOLECULAR	m/z calculado	m/z experimental	
3- <i>O</i> -metil- <i>chiro</i> -inositol (pinitol)	C ₇ H ₁₃ O ₆	193.0706	193.0714	3,96
Kaempferol-3- <i>O</i> -β-D- galactopiranosil- (6''→1''')- <i>O</i> -α-L- rhamnopiranosídeo	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	593,1501	593.1524	3,85

Quercetina-3-O-β-D- glicopironasil-(6''→1''')- O-α-L rhamnopiranosídeo(rutina)	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	609,145	609,147	2
---	---	---------	---------	---

Após o fracionamento do extrato da *G. graciliflora* realizado por coluna filtrante em funil de placa porosa e monitorado por CCD, as frações resultantes, que continham as marcações dos compostos do grupo de interesse, foram reunidas de acordo com o perfil de similaridade e as colorações diante do revelador empregado. Foram obtidas 3 frações finais: fração metanólica, sub-fração metanólica e hidrometanólica (50:50).

3.2 Atividade antimicrobiana

O extrato da *G. graciliflora* e sua fração metanólica apresentaram moderada atividade fungistática frente à *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*. Todas as amostras testadas apresentaram forte atividade fungistática sobre *C. dubliniensis*, conforme classificação de Holetz et al. (2002), sem evidências de atividade fungicida até a maior concentração testada. (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição dos valores das Concentrações Inibitória Mínima (CIM) e Fungicida Mínima (CFM) do extrato da *G. graciliflora* e suas frações, de acordo com a espécie de *Candida*.

AMOSTRAS	LEVEDURAS							
	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. dubliniensis</i>	
	CIM µg/mL	CFM µg/mL	CIM µg/mL	CFM µg/mL	CIM µg/mL	CFM µg/mL	CIM µg/mL	CFM µg/mL
<i>G. graciliflora</i>	125	>2000	250	>2000	125	>2000	3,90625	>2000
Fração metanólica	125	>2000	250	>2000	250	>2000	3,90625	>2000
Sub-fração metanólica	2000	>2000	>2000	>2000	250	>2000	7,8125	>2000

Fração hidrometanólica (50:50)	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	31,25	>2000
Nistatina	0,9765	-	0,9765	-	0,9765	-	0,9765	-

3.3 Atividade antibiofilme

A análise de variância da atividade metabólica e da contagem de microrganismos viáveis nos tempos de 24 e 48 horas demonstrou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) apenas para a atividade metabólica em 48 horas e para a contagem de células viáveis em 24 horas (Tabela 3).

Tabela 3. Análise de variância das variáveis dependentes correspondentes à atividade metabólica e à contagem de células viáveis em biofilmes após 24 e 48 horas.

		Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados	F	p
Atividade Metabólica 24h	Entre grupos	,005	5	0,001	2,722	0,053
	Dentro dos grupos	,007	18	0,000		
	Total	,013	23			
Atividade Metabólica 48h	Entre grupos	,019	5	0,004	8,991	< 0,001
	Dentro dos grupos	,007	18	0,000		
	Total	,026	23			
UFC Biofilme 24h	Entre grupos	4,05E+13	5	8,10E+12	10,076	< 0,001
	Dentro dos grupos	1,44E+13	18	8,04E+11		
	Total	5,50E+13	23			
UFC Biofilme 48h	Entre grupos	1,65E+13	5	3,30E+12	2,495	0,070
	Dentro dos grupos	2,38E+13	18	1,32E+12		

Total	4,03E+13	23
-------	----------	----

A CIM (125 µg/mL) e a CIM/2 (62,5 µg/mL) foram as concentrações que reduziram significativamente ($p < 0,05$) o total de células viáveis em relação ao controle de crescimento no tempo de 24 horas, mantendo a menor quantidade de UFC/mL de *C. albicans* viáveis (34,1% e 36,9%, respectivamente) (Fig. 6 (A e B)). Porém, não se verificou diferença estatisticamente significativa entre as diferentes concentrações do extrato ($p > 0,05$). A CIM foi a concentração que reduziu em maior intensidade a atividade metabólica das células de *C. albicans* (50,79 %), porém não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre o efeito das concentrações do extrato nem em relação ao controle de crescimento no tempo de 24 horas (Fig. 6 (C e D)).

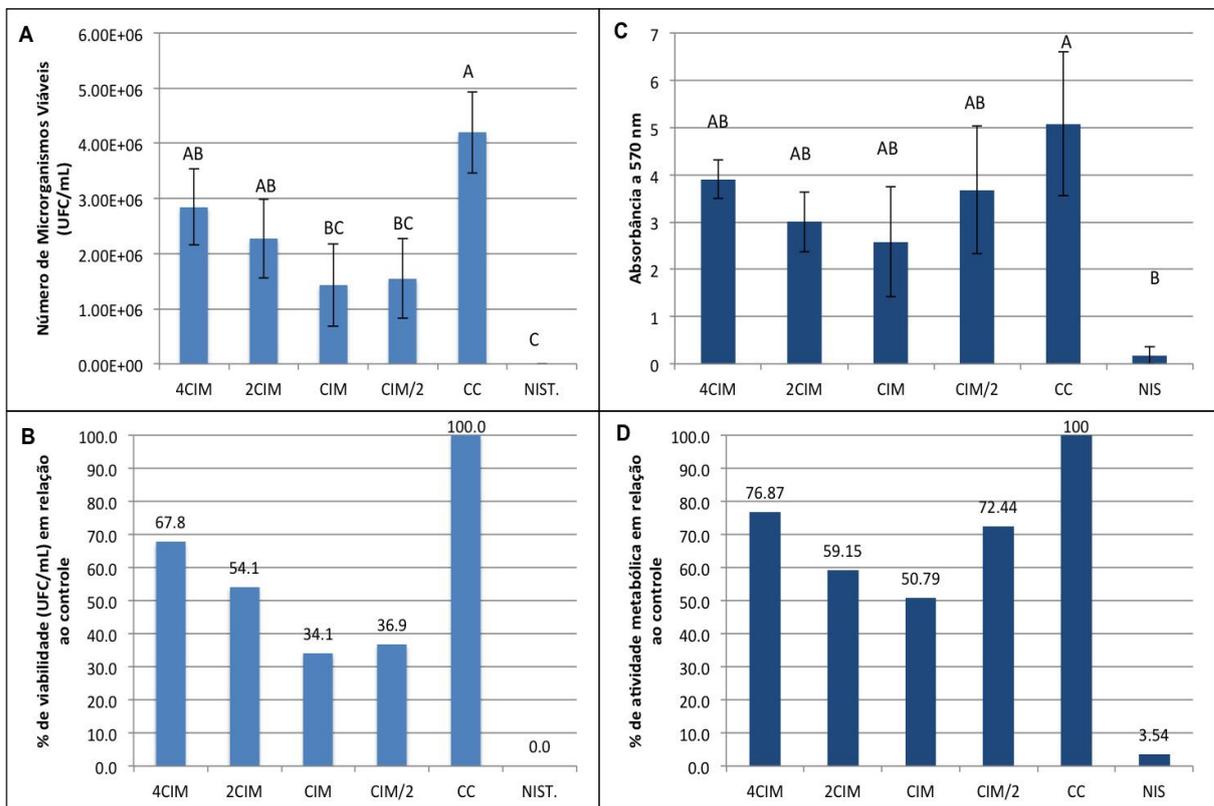


Fig. 6. Viabilidade celular e atividade metabólica, em 24 horas, de células de *C. albicans*, após a exposição a diferentes concentrações do extrato de *G. graciliflora*. **A.** Número de microrganismos viáveis de *C. albicans* (UFC/mL). **B.** Percentual de viabilidade celular *C. albicans* (UFC/mL) em função do controle de crescimento. **C.** Absorbância da atividade metabólica (570 nm). **D.** Percentual de atividade metabólica das células de *C. albicans* em função do controle de crescimento da levedura.

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente entre os grupos ($p < 0,05$).

(4CIM = 500 $\mu\text{g/mL}$; 2CIM = 250 $\mu\text{g/mL}$; CIM = 125 $\mu\text{g/mL}$; CIM/2 = 62,5 $\mu\text{g/mL}$; CC = controle de crescimento e NIS = Nistatina).

A CIM/2 foi a concentração que reduziu em maior quantidade o número de células viáveis de *C. albicans* (49,6 %), porém não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre o efeito das concentrações do extrato nem em relação ao controle de crescimento no tempo de 48 horas (Fig. 7 (A e B)). A concentração 2CIM (500 $\mu\text{g/mL}$) foi a mais significativa ($p < 0,05$) em reduzir a atividade metabólica da *C. albicans*, mantendo 43,51% das células ativas, em relação ao controle de crescimento no tempo de 48 horas. Porém, não se verificou diferença estatisticamente significativa entre as diferentes concentrações do extrato ($p > 0,05$). (Fig. 7 (C e D)).

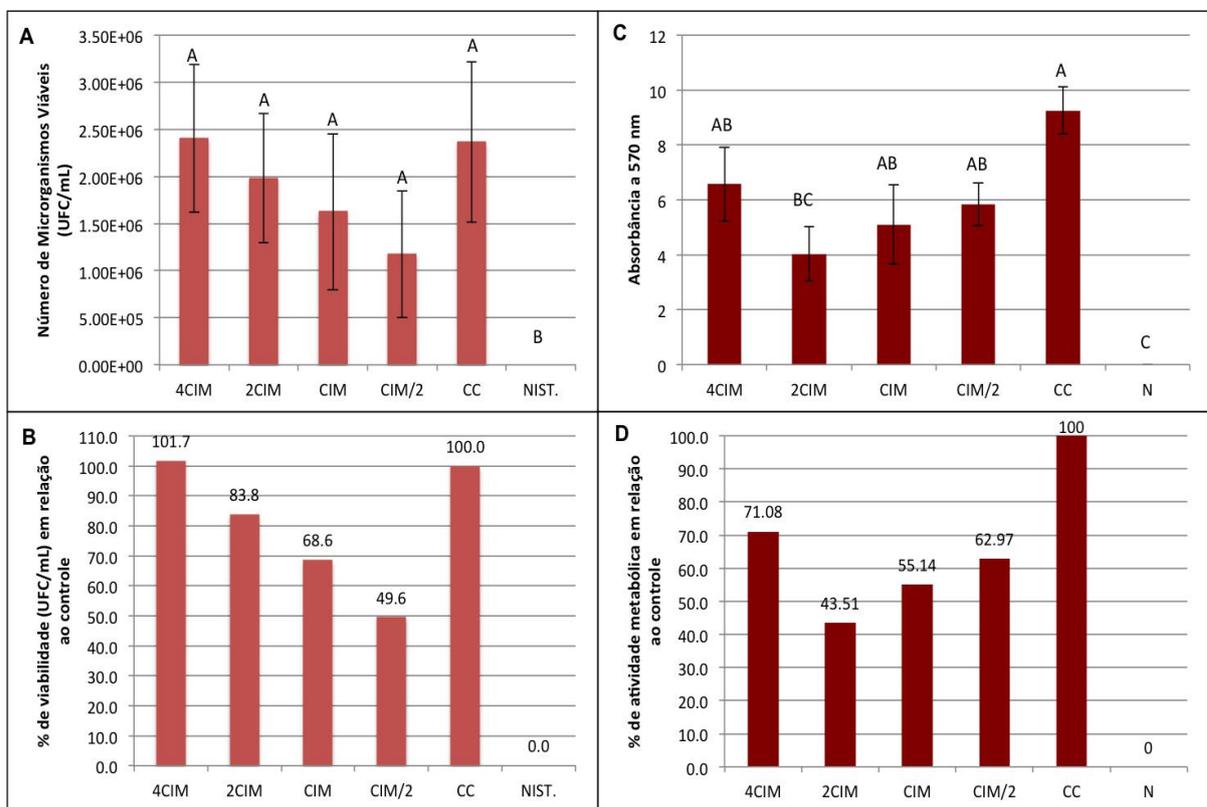


Fig. 7. Viabilidade celular e atividade metabólica, em 48 horas, de células de *C. albicans*, após a exposição a diferentes concentrações do extrato de *G. graciliflora*. **A.** Número de microrganismos viáveis de *C. albicans* (UFC/mL). **B.** Percentual de viabilidade celular *C. albicans* (UFC/mL) em função do controle de crescimento. **C.** Absorbância da atividade metabólica (570 nm). **D.** Percentual de atividade metabólica das células de *C. albicans* em função do controle de crescimento da levedura.

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente entre os grupos ($p < 0,05$).

(4CIM = 500 $\mu\text{g/mL}$; 2CIM = 250 $\mu\text{g/mL}$; CIM = 125 $\mu\text{g/mL}$; CIM/2 = 62,5 $\mu\text{g/mL}$; CC = controle de crescimento e NIS = Nistatina).

A análise do pH do meio de cultivo do biofilme, após os períodos de 24 e 48 horas, revelou que a média dos pHs do biofilme tratado foi maior, ou seja, menos ácido do que o biofilme sem tratamento (Tabela 3).

Tabela 4. Distribuição dos valores do potencial hidrogeniônico obtidos das soluções de cultivo dos biofilmes de *C. albicans*, de 24 e 48 horas, na presença ou não de tratamento.

SOLUÇÕES	POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH)	
	BIOFILME DE 24 HORAS	BIOFILME DE 48 HORAS
<i>G. graciliflora</i> - 4CIM	3,81	3,48
<i>G. graciliflora</i> - 2CIM	3,53	3,41
<i>G. graciliflora</i> - CIM	3,45	3,35
<i>G. graciliflora</i> - CIM/2	3,42	3,34
CONTROLE DE CRESCIMENTO	3,37	3,25
NISTATINA - 100 $\mu\text{g/mL}$	4,54	4,32

3.4 Atividade antiproliferativa

A doxorubicina produziu efeito citocida para todas as linhagens celulares testadas (Fig. 8). O extrato da *G. graciliflora* apresentou atividade citostática inespecífica. Inibiu a proliferação das células de todas as linhagens tumorais testadas, sem evidências de potencial citocida até a concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 9). A fração metanólica produziu efeito citostático sobre as células das linhagens testadas, exibindo perfil citocida para as linhagens M-CF7, 786-0 e NCI/ADR-RES (Fig. 10). A sub-fração metanólica e a fração hidrometanólica (50:50) não apresentaram efeito citotóxico sobre as linhagens testadas, até a concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ (Figs. 11 e 12). A atividade antiproliferativa do extrato e suas

frações foi expressa em GI_{50} (concentração da amostra necessária para inibir 50% do crescimento celular) (Tabela 4).

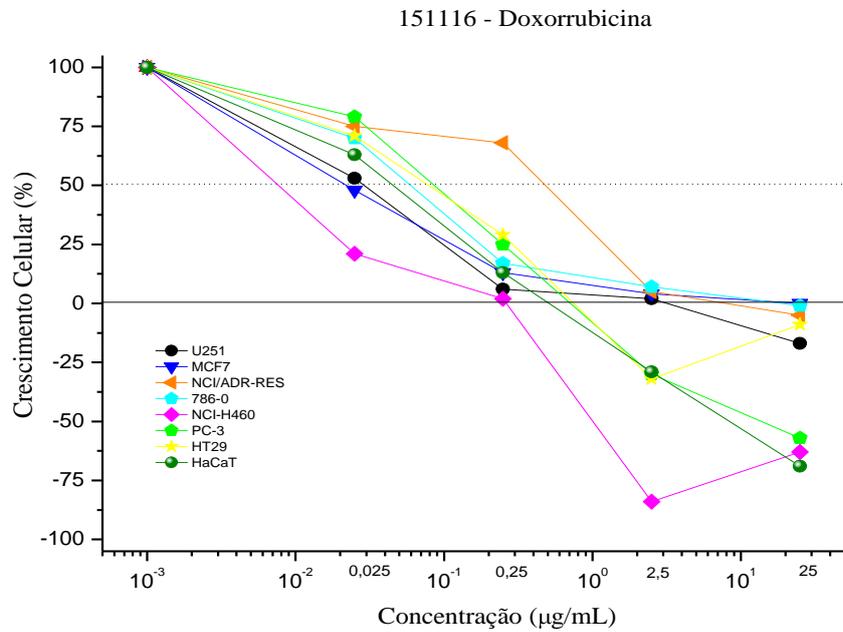


Fig. 8. Proliferação das linhagens celulares em função da concentração (0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu\text{g/mL}$) após 48 horas de exposição ao quimioterápico Doxorrubicina (controle positivo).

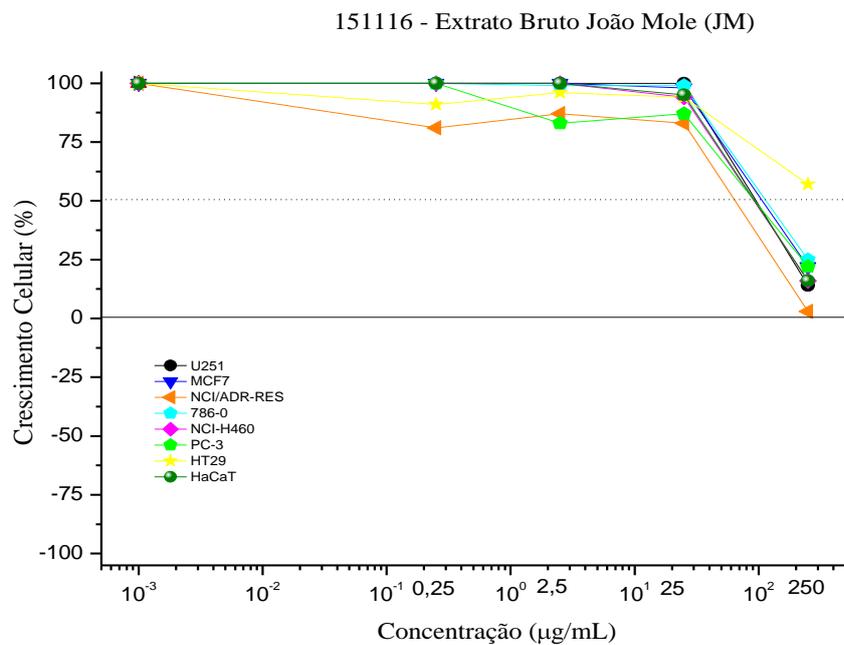


Fig. 9. Proliferação das linhagens celulares em função da concentração (0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu\text{g/mL}$) após 48 horas de exposição ao extrato da *G. graciliflora*.

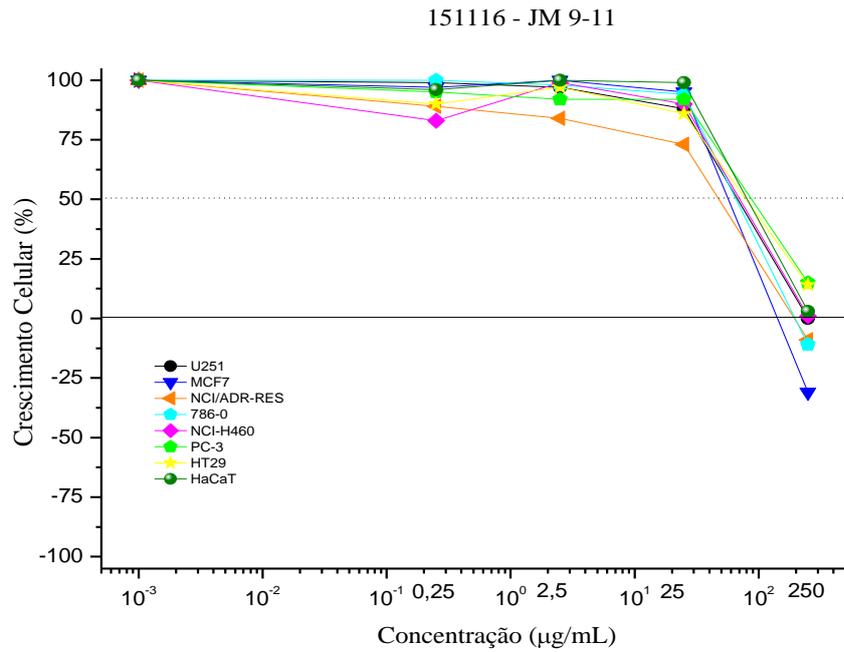


Fig. 10. Proliferação das linhagens celulares em função da concentração (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) após 48 horas de exposição à fração metanólica do extrato da *G. graciliflora*.

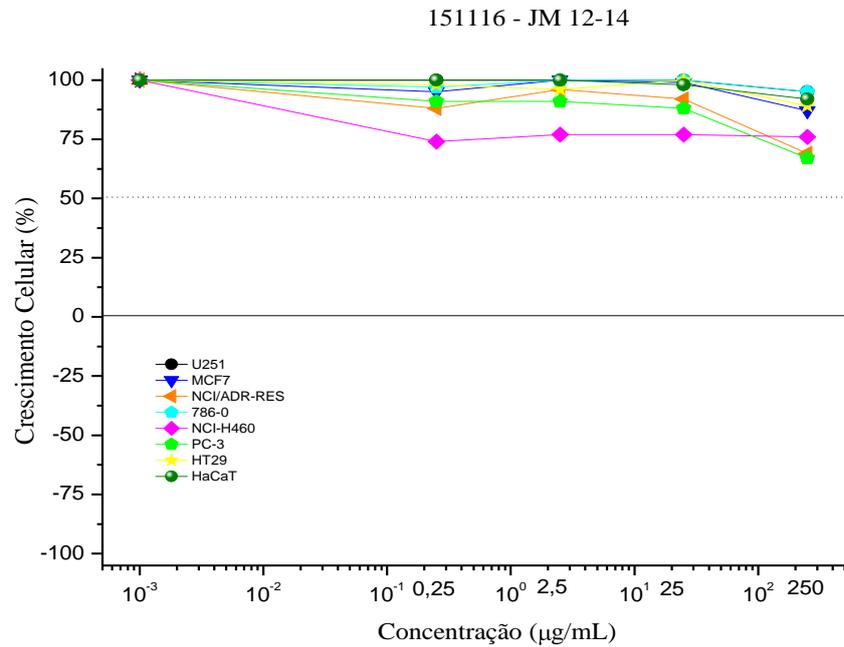


Fig. 11. Proliferação das linhagens celulares em função da concentração (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) após 48 horas de exposição à sub-fração metanólica do extrato da *G. graciliflora*.

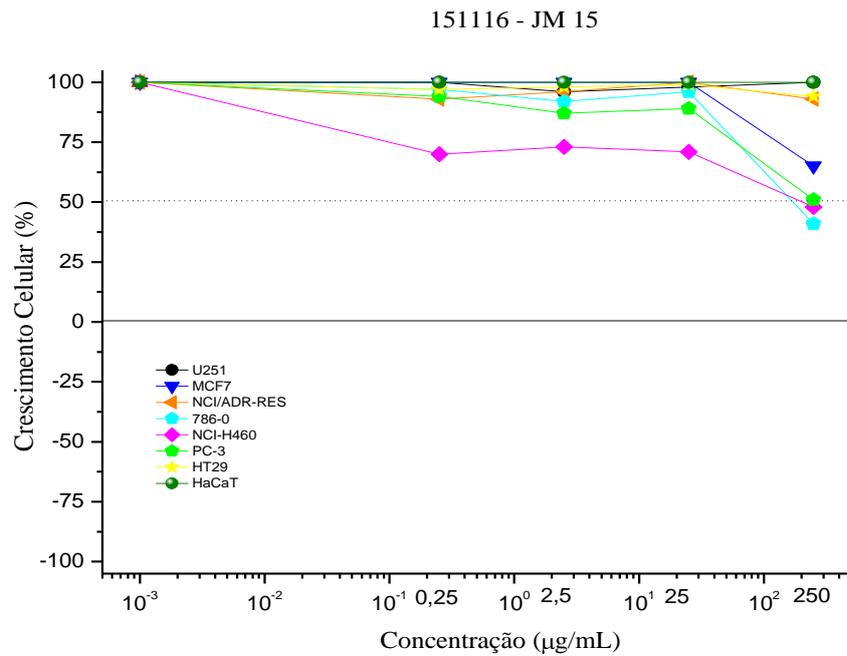


Fig. 12. Proliferação das linhagens celulares em função da concentração (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) após 48 horas de exposição à fração hidrometanólica (50:50) do extrato da *G. graciliflora*.

Tabela 5. Valores de GI₅₀ (*Growth Inhibition 50* – concentração da amostra necessária para inibir 50% do crescimento celular) do extrato da *G. graciliflora* e de suas frações sobre cultura de células tumorais humanas.

LINHAGENS	Doxorrubicina	GI ₅₀ (µg/mL)			
		<i>G. graciliflora</i>	Fração metanólica	Sub-fração metanólica	Fração hidrometanólica (50:50)
U251 Glioma	0,03	211,32	40,56	> 250	> 250
MCF-7 Mama	< 0,025	142,08	33,64	> 250	> 250
NCI-ADR/RES Ovário resistente	0,36	52,57	28,55	> 250	> 250

786-0	0,06	160,23	33,19	> 250	195,64
Rim					
NCI-H460	< 0,025	105,18	52,72	> 250	> 250
Pulmão					
PC-3	0,08	95,92	95,41	> 250	> 250
Próstata					
HT-29	0,07	> 250	78,84	> 250	> 250
Cólon					
HaCat	0.04	109,06	92,74	> 250	> 250
Queratinócito					
Mean log	< -1,03	> 2,16	1,71	> 2,39	> 2,38
GI₅₀					

3.5 Citotoxicidade

O extrato da *G. graciliflora* apresentou perfil não-tóxico sobre cultura de células de macrófagos RAW 264.7 até a concentração de 62,5 µg/mL, mantendo a viabilidade celular acima de 80% (Fig. 13). A análise de variância permitiu observar que houve diferença estatística entre a maior concentração utilizada (125 µg/mL) e as demais concentrações (Fig. 13).

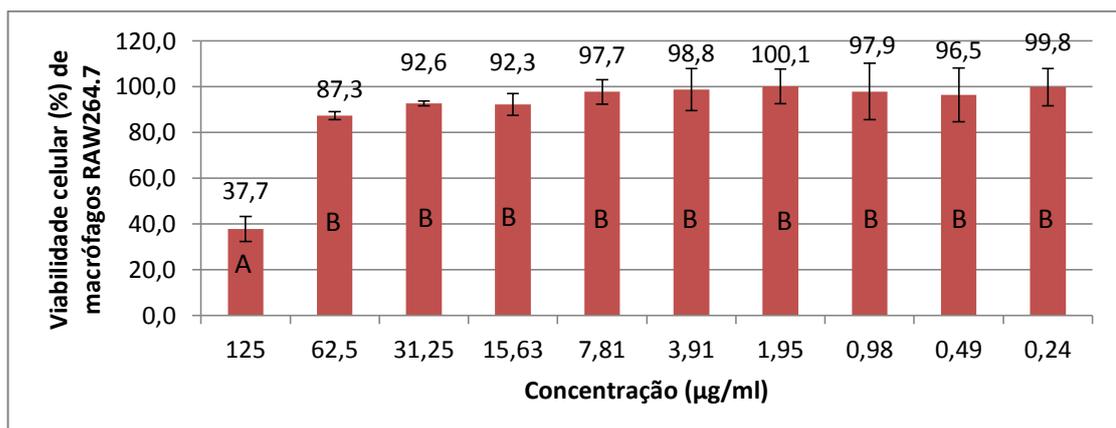


Fig. 13. Distribuição do percentual de viabilidade celular de linhagem de macrófagos RAW 264.7 de acordo com a concentração do extrato de *G. graciliflora*.

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente entre os grupos ($p < 0,05$).

4. Discussão

A *G. graciliflora* possui metabólitos secundários que conferem diferentes propriedades farmacológicas à planta e justificam a sua utilização na medicina popular. Os espectros obtidos através de ESI-MS permitiram a identificação da quercetina-3-O- β -D-glicopiranosil-(6'' \rightarrow 1''')-O- α -L-rhamnopiranosídeo (rutina) e do kaempferol-3-O- β -D-galactopiranosil-(6'' \rightarrow 1''')-O- α -L-rhamnopiranosídeo, compostos pertencentes ao grupo dos flavonoides, e do 3-O-metil-*chiro*-inositol (pinitol), pertencente à classe dos polióis cíclicos (Gupta e Uang, 2014).

Os flavonoides estão associados a diferentes propriedades farmacológicas, que incluem as atividades antimicrobiana e antioxidante. Esses compostos podem inativar enzimas e complexarem-se com proteínas da parede celular dos microrganismos, configurando os prováveis mecanismos de ação antimicrobiana (Mendes et al., 2011; Silva et al., 2012a). Além disso, possuem forte ação antioxidante, o que justifica sua capacidade de regular a resposta imunológica (Veza et al., 2016).

A rutina e o kaempferol, por exemplo, são conhecidos por seus efeitos antioxidante, antitumoral, antimicrobiano e anti-inflamatório (He et al., 2016). Esses compostos apresentam atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis* e *C. albicans*, bem como potencial sobre o vírus HSV-1 (herpes vírus simples – tipo 1) e atividade antiproliferativa sobre linhagem de hepatocarcinoma humano. (Ozçelik et al., 2011; Rashed e Butmariu, 2014; Singh et al., 2016). Os polióis, por sua vez, produtos do metabolismo de carboidratos, estão associados a forte atividade antioxidante (Williamson et al., 2002; Agarie et al., 2009).

Considerando os critérios estabelecidos por Holletz et al. (2002) a atividade antifúngica da *G. graciliflora* foi classificada como moderada sobre as espécies *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata*. A *C. dubliniensis* foi a espécie mais susceptível a todas as amostras testadas, cujo potencial fungistático foi considerado forte. Esses resultados são positivos, uma vez que as espécies de *Candida* não-albicans têm sido associadas à infecções mais severas por apresentarem uma maior resistência aos antifúngicos disponíveis (Silva et al., 2012c;

Coronado-Castellote e Jímenes-Soriano, 2013). As condições e consequências da candidíase, principalmente em pacientes imunocomprometidos, direcionam a busca por novos agentes efetivos no tratamento dessa infecção, na tentativa de impedir o avanço da infecção, inicialmente restrita às superfícies da pele e das mucosas, para a forma mais agressiva, com invasão dos tecidos mais profundos e disseminação para outros órgãos (Santos et al., 2013).

O extrato da *G. graciliflora* e suas frações apresentam perfil fungistático, sem evidências de capacidade fungicida ($>2000 \mu\text{g/mL}$), ou seja, o extrato é capaz de inibir o crescimento da levedura sem causar sua morte. Isto pode ser favorável por controlar a infecção, sem provocar o desequilíbrio da microbiota oral normal, comumente causado por substâncias fungicidas. Esses resultados podem ser atribuídos ao kaempferol e a rutina, presentes na composição do extrato da *G. graciliflora* e conhecidos como potentes agentes antibacterianos e antifúngicos (Kataoka et al. 2001; Tatsimo et al. 2012; Pinho et al. 2014). Esses compostos podem inativar proteínas de adesão e transporte, bem como gerar a ruptura da membrana da célula microbiana (Alavarce et al., 2015).

A redução do metabolismo das células do biofilme tratado com o extrato da *G. graciliflora*, verificada no ensaio do MTT, pode estar relacionada à diminuição do número de células de *C. albicans* viáveis (Basso et al., 2011). Geralmente, a atividade metabólica é diretamente proporcional ao número de células viáveis (Moura et al., 2006; Seneviratne et al., 2009; Silva et al., 2008; Silva et al., 2010). Porém, os dados referentes à quantificação (UFC/mL) de células de *C. albicans* viáveis e à atividade metabólica não foram observados na mesma intensidade no biofilme de 48 horas. A redução do número de células (UFC/mL) foi maior no biofilme tratado com o extrato na concentração de $62,5 \mu\text{g/mL}$ e a redução da atividade metabólica foi mais efetiva na concentração de $250 \mu\text{g/mL}$. Esta redução da atividade metabólica pode ter sido decorrente do estresse intracelular promovido pela ação do extrato quando numa concentração duas vezes maior em relação à CIM (Basso et al., 2011). Por outro lado, a diminuição do número de células viáveis de *C. albicans* no biofilme tratado com o extrato na concentração de $62,5 \mu\text{g/mL}$ pode ter sido decorrente de uma ação antifúngica inicial, com desagregação das células e inibição do biofilme, sem alteração significativa em sua atividade metabólica (Basso et al., 2011).

A redução da atividade metabólica da *C. albicans* no biofilme maduro foi mais efetiva com o extrato na concentração duas vezes maior do que a concentração inibitória mínima. Sabe-se que a concentração ativa de um agente antimicrobiano é comumente maior para microrganismos organizados em biofilme, quando comparados com aqueles que crescem em culturas planctônicas. Os biofilmes podem ser mais resistentes aos agentes antimicrobianos

devido à presença da matriz extracelular que impede a penetração do fármaco no seu interior, limitando sua ação sobre as células fúngicas (Nett et al., 2011; Oliveira et al., 2013). Por outro lado, a maior concentração do extrato utilizada neste estudo (500 µg/mL) não foi a mais efetiva, tanto no teste do MTT como na contagem de UFC/mL. Isto pode ser resultante da desagregação de uma parte das células de *C. albicans* em um estágio inicial, em que as células mais resistentes foram selecionadas e estimuladas a se proliferarem em maior intensidade (Sugata et al., 2014).

A *C. albicans* possui a capacidade de se desenvolver e colonizar sítios no hospedeiro humano com valores distintos de pH. Na cavidade oral, o pH é neutro devido à capacidade tampão da saliva (Sosinska et al., 2011). Porém, condições ambientais como dieta do hospedeiro e a diminuição do fluxo salivar podem levar à alteração do pH (Vylkova et al., 2011). Clinicamente, a adesão e a colonização da *C. albicans* sobre a superfície interna da prótese dentária podem propiciar um ambiente ácido, com ativação de fatores de virulência e estabelecimento da infecção (Bensen et al., 2004).

O meio de cultivo para *C. albicans* utilizado no ensaio do biofilme foi suplementando com glicose (1%) como fonte disponível de carbono e nutriente para a proliferação da levedura (Pemmeraju et al., 2016). O metabolismo da glicose pela *C. albicans* aumenta sua atividade metabólica, gerando uma maior adesão celular e formação de biofilme (Mayer et al., 2013). O pH do meio do biofilme tratado com o extrato da *G. graciliflora* foi menos ácido do que naquele sem tratamento. Esse resultado pode estar diretamente relacionado a uma diminuição da capacidade da levedura em metabolizar as fontes de carbono disponíveis no meio. A alteração do pH gera estresse na levedura por interferência no gradiente de prótons da membrana plasmática, dificultando a absorção de nutrientes (Davis, 2009).

O extrato da *G. graciliflora* inibiu o crescimento das linhagens celulares testadas, porém não apresentou potencial antiproliferativo significativo. Segundo os critérios utilizados pelo NCI (Instituto Nacional do Câncer), amostras com log GI₅₀ maior que 1,5 não apresentam atividade; log GI₅₀ entre 1,1 e 1,5 apresentam fraca atividade anticâncer; log GI₅₀ entre 0 e 1, moderada atividade e log GI₅₀ menores que zero, potente atividade (Fouche et al., 2008).

A fração metanólica desempenhou atividade citostática para a maioria das linhagens de células testadas e comportamento citocida sobre as linhagens M-CF7 (mama), 786-0 (rim) e NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), sendo esta última, a linhagem mais susceptível (GI₅₀ = 28,55 µg/mL). O NCI considera como promissor um extrato que apresente valores de GI₅₀ menores que 30 µg/mL (Suffness e Pezzuto, 1990), o

que pode sugerir uma seletividade desta fração sobre a linhagem de células tumorais de ovário.

A atividade antiproliferativa das células tumorais da fração metanólica do extrato da *G. graciliflora* pode está associada à presença dos flavonoides. Esta classe de compostos inibe os efeitos do câncer através do combate aos radicais livres, modificação de enzimas ativadoras da carcinogênese e inibição do fator de transcrição de proteínas ativadas por fatores de promoção do tumor (Androutsopoulos et al., 2010; Celik e Arinç, 2010).

Verificou-se que o kaempferol possui significativo potencial antiproliferativo sobre células tumorais humanas de linhagens de câncer uterino (SiHa e HeLa), câncer de mama (MCF-7), câncer de estômago (SGC-7901) e câncer de pulmão (A549) (Liao et al., 2016; Tu et al., 2016). A rutina também teve seu potencial antiproliferativo estabelecido sobre linhagens tumorais de cólon (HT-29) (Guon e Chang, 2016) e glioma (GL-15) (Santos et al., 2011). A proliferação e viabilidade destas linhagens celulares submetidas ao tratamento com estes compostos foi significativamente reduzida, devido à elevação do cálcio intracelular, condensação nuclear, fragmentação do DNA e ruptura da membrana mitocondrial, induzindo ao mecanismo de apoptose (Santos et al., 2011; Guon e Chang, 2016; Liao et al., 2016; Tu et al., 2016).

O pinitol, por sua vez, apresenta atividade quimioterápica *in vitro* sobre linhagens de câncer de pulmão, mama e bexiga (Zhan e Lou 2007; Rengarajan et al., 2012), provavelmente, por inibir o estresse oxidativo celular e o processo inflamatório (Rengarajan et al., 2012). Está relacionado também à capacidade de reduzir a metástase em câncer de pulmão (Sethi et al., 2008) e de próstata (Lin et al., 2013). Este efeito foi observado devido à redução do RNAm e da expressão de integrinas, moléculas de adesão celular que desempenham um papel central no controle da adesão, migração e diferenciação celular e do mecanismo de apoptose (Lin et al., 2013), intimamente relacionadas à progressão tumoral e ao processo de metástase (Makrilia et al., 2009).

A atividade citotóxica do extrato foi avaliada sobre linhagem de macrófagos murinos (RAW 264.7), cujo método é amplamente utilizado em estudos de citotoxicidade *in vitro* (Oliveira et al., 2013; Oliveira et al., 2014a; Oliveira et al., 2014b; Benso et al., 2015; Bueno-Silva et al., 2015; Dzoyem et al., 2015; Jang et al., 2015; Tan et al., 2015). É um modelo adequado para o rastreio de novas substâncias com potencial anti-inflamatório e para a avaliação de inibidores das vias que conduzem à indução de enzimas e citocinas pró-inflamatórias (Yang et al., 2012).

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (*International Standard Organization*), ISO 10993-5: 2009, concentrações que mantêm a viabilidade celular abaixo de 70% são consideradas citotóxicas. Neste estudo, o extrato da *G. graciliflora* não ocasionou efeito citotóxico nos macrófagos até a concentração de 62,5 µg/mL, mantendo a viabilidade celular acima de 80%.

A rotina apresenta baixa citotoxicidade sobre cultura de células de macrófagos RAW 264.7, com manutenção da viabilidade destas células acima de 80%, até a concentração de 250 µg/mL (Kazłowska et al., 2010; Su et al., 2014). O kaempferol também não apresenta efeitos significativos sobre a viabilidade celular de macrófagos até a concentração de 50 µM (Warat et al., 2015).

Os resultados da citotoxicidade em macrófagos podem definir as concentrações a serem utilizadas em ensaios *in vitro* de atividade anti-inflamatória, analisada por meio da estimulação de macrófagos e mensuração da produção de óxido nítrico (Oliveira et al., 2014b). O óxido nítrico é considerado um importante mediador pró-inflamatório em vários eventos fisiológicos e fisiopatológicos (Dzoyem et al., 2015). Agentes inibidores da sua produção podem ser considerados com forte potencial anti-inflamatório (Benso et al., 2015; Bueno-Silva et al., 2015; Dzoyem et al., 2015).

Os extratos de plantas podem ser investigados sobre diferentes propósitos terapêuticos, representando uma importante contribuição para a ciência. Estudos com a planta *G. graciliflora* ainda são iniciais e muitas das propriedades biológicas e farmacológicas, de seus componentes necessitam ser analisadas, no sentido de compreender e confirmar suas indicações terapêuticas. Os resultados deste estudo apontam o extrato como uma possível fonte de substâncias bioativas, que podem ser utilizadas no desenvolvimento de novas formulações para o tratamento da candidíase oral.

6. Conclusões

O extrato das folhas da *Guapira graciliflora* Mart. possui atividade antifúngica, capaz de inibir *in vitro* o crescimento de espécies de *Candida* e a formação do biofilme de *C. albicans*, sem evidências de alteração significativa na viabilidade de células de linhagens tumorais e não tumorais humanas.

Referências

- Agarie, S., Kawaguchi, A., Kodera, A., Sunagawa, H., Kojima, H., Nose, A., Nakahara, T., 2009. Potential of the commonice plant, *Mesembryanthemum crystallinum* as a newhigh-functional food as evaluated by polyol accumulation. *Plant Prod. Sci.* 12 (1), 37-46.
- Agra, M.F., Silva, K.N., Basílio, I.J.L.D., Freitas, P.F., Barbosa-Filho, J.M., 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.* 18 (3), 472-508.
- Alavarce, R.A.S., Saldanha, L.L., Almeida, N.L.M., Porto, V.C., Dokkedal, A.L., Lara, V.S., 2015. The Beneficial Effect of *Equisetum giganteum* L. against *Candida* Biofilm Formation: New Approaches to Denture Stomatitis. 2015, 9p.
- Androutsopoulos, V.P., Papakyriakou, A., Vourloumis, D., Tsatsakis, A.M., Spandidos, D.A., 2010. Dietary flavonoids in cancer therapy and prevention: Substrates and inhibitors of cytochrome P450 CYP1 enzymes. *Pharmacol Ther.* 126 (1), 9–20.
- Bakhshi, M., Taheri, J.B., Shabestari, S.B., Tanik, A., Pahlevan, R., 2012. Comparison of therapeutic effect of aqueous extract of garlic and nystatinmouthwash in denture stomatitis. *Gerodontology.* 29 (2), 680-684.
- Bansod, S., Rai, M., 2008. Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigates* and *A. niger*. *World Journal of Medical Sciences* 3 (2), 81-88.
- Basso, F.G., Oliveira, C.F., Fontana, A., Kurachi, C., Bagnato, V.S., Spolidório, D.M., Hebling, J., Costa, C.A.S., 2011. *In Vitro* Effect of Low-Level Laser Therapy on Typical Oral Microbial Biofilms. *Braz. Dent. J.* 22 (6), 502-510.
- Bensen, E.S., Martin, S.J., Li, M., Berman, J., Davis, D.A., 2004. Transcriptional profiling in *Candida albicans* reveals new adaptive responses to extracellular pH and functions for Rim101p. *Mol. Microbiol.* 54 (5), 1335-1351.
- Benso, B., Rosalen, P.L., Alencar, S.M., Murata, R.M., 2015. *Malva sylvestris* Inhibits Inflammatory Response in Oral Human Cells. An *In Vitro* Infection Model. *Plos One* 10 (10), 15p.
- Bueno-Silva, B., Kawamoto, D., Ando-Suquimoto, E.S., Alencar, S.M., Rosalen, P.L., Mayer, M.P., 2015. Brazilian Red Propolis Attenuates Inflammatory Signaling Cascade in LPS-Activated Macrophages. *Plos One* 10 (12), 14p.
- Celik, H., Arinç, E., 2010. Evaluation of the protective effects of Quercetin, rutin, naringenin and trolox against Idarubicin-induced DNA damage. *J Pharm Pharm Sci.* 13 (2), 231–241.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts - CLSI M27-A3, Wayne, PA, USA, 28 (14), 13p.

- Conorado-Castellote, L., Jiménez-Soriano, Y., 2013. Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. *J Clin Exp Dent.* 5 (5), 279-286.
- Coelho, F.B.R., DalBelo, C.A., Lolis, S.F., Santos, M.G., 2005. Levantamento etnofarmacológico realizado na comunidade Mumbuca localizada no Jalapão – TO. *Rev. Bras. Farm.* 2 (2), 52-55.
- Davis, D.A., 2009. How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence. *Curr. Opin. Microbiol.* 12 (4), 365-370.
- Dzoyem, J. P., Tsamo, A.T., Melong, R., Mkounga, P., Nkengfack, A.E., McGaw, L.J., Eloff, J.N., 2015. Cytotoxicity, nitric oxide and acetylcholinesterase inhibitory activity of three limonoids isolated from *Trichilia welwitschii* (Meliaceae). *Biol. Res.* 48, 6p.
- 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., 2015. Does Scientific Evidence for the Use of Natural Products in the Treatment of Oral Candidiasis Exist? A Systematic Review. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2015, 1-8.
- Fouche, G., Cragg, G.M., Pillay, P., Kolesnikova, N., Maharaj, V.J., Senabe, J., 2008. *In vitro* anticancer screening of South African plants. *J. Ethnopharmacol.* 119 (3), 455-461.
- Freitas-Fernandes, F.S., Cavalcanti, Y.W., Ricomini Filho, A.P., Silva, W.J., Del Bel Cury, A.A., Bertolini, M.M., 2014. 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.* 112 (6), 1349-1355.
- Guon, T.E, Chung, H.S., 2016. Hyperoside and rutin of *Nelumbo nucifera* induce mitochondrial apoptosis through a caspase-dependent mechanism in HT-29 human colon cancer cells. *Oncoll Lett.* 11 (4), 2463-2470.
- Gupta, B., Huang, B., 2014. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical and molecular characterization. *Int. J.Genomics* 2014, 18p.
- He, X., Bai, Y., Zhao, Z., Wang, X., Fang., J., Huang, L., Zeng, M., Zhang, Q., Zhang, Y., Zheng, X., 2016. Local and traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of *Sophora japonica* L.: A review. *J. Etnopharmacol.* 187, 160-182.
- Holetz, F.B., Pessini, G.L., Sanches, N.R., Cortez, D.A., Nakamura, C.V., Filho, B.P., 2002. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97 (7), 1027-1031.
- International Standard Organization (ISO - 10993-5), 2009. Biological evaluation of medical devices -Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity, 3rd edition, 1-42.
- Jang, M., Jeong, S., Kim, B, Kim, J., 2015. Extraction Optimization for Obtaining *Artemisia capillaris* Extract with High Anti-Inflammatory Activity in RAW 264.7 Macrophage Cells. *Biomed Res. Int.* 2015, 9p.

- Kataoka, M., Hirata, K., Kunikata, T., Hirata, K., Kunikata, T., Ushio, S., Iwaki, K., Ohashi, K., Ikeda, M., Kurimoto, M., 2001. Antibacterial action of tryptanthrin and kaempferol, isolated from the indigo plant (*Polygonum tinctorium* Lour.), against *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils. *J Gastroenterol.* 36 (1), 5–9.
- Kazłowska, K., Hsu, T., Hou, C., Yang, W., Tsai, G., 2010. Anti-inflammatory properties of phenolic compounds and crude extract from *Porphyra dentate*. *J. Ethnopharmacol.* 128 (1), 123-130.
- Liao, W., Chen, L., Ma, X., Jiao, R., Li, X., Wang, Y., 2016. Protective effects of kaempferol against reactive oxygen species-induced hemolysis and its antiproliferative activity on human cancer cells. *Eur J Med Chem.* 114, 24-32.
- Lin, T., Tan, T., Tsai, T, Chen, C., Hsieh, T., Lee, S., Liu, H., Chen, W., Tang, C., 2013. D-pinitol Inhibits Prostate Cancer Metastasis through Inhibition of α V β 3 Integrin by Modulating FAK, c-Src and NF- κ B Pathways. *Int J Mol Sci.* 14 (5), 9790-9802.
- Makrilia, N., Kollias, A., Manolopoulos, L., Syrigos, K., 2009. Cell adhesion molecules: Role and clinical significance in cancer. *Cancer Invest.* 27 (10), 1023–1037.
- Mayer, F.L., Wilson, D., Hube, B., 2013. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence.* 4 (2), 119-128.
- 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., 2011. Antimicrobial Activity of Ethanol Extracts of *Peperomia pellucida* and *Portulaca pilosa*. *Rev. Ciên. Farm. Básica Apl.* 32 (1), 121-125.
- Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J., Boyd, M., 1991. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 83 (11), 757-766.
- Moura, J.S., Silva, W.J., Pereira, T., Del Bel Cury, A.A., Garcia. R.C.R., 2006. Influence of acrylic resin polymerization methods and saliva on the adherence of four *Candida* species. *J. Prosthet. Dent.* 96 (3), 205-211.
- Nett, J.E., Sanchez, H., Cain, M.T., Ross, K.M., Andes, D.R., 2011. Interface of *Candida albicans* biofilm matrix-associated drug resistance and cell wall integrity regulation. *Eukaryot. Cell* 10 (12), 1660-1669.
- Oliveira, J.R., Almeida, R.B.A., Vilela, P.G.F., Oliveira, F.E., Rocha, R.F., Jorge, A.O., Oliveira, L.D. 2014a. Control of microorganisms of oral health interest with *Arctium lappa* L. (burdock) extract non-cytotoxic to cell culture of macrophages (RAW 264.7). *Arch. Oral Biol.* 59 (8), 808-814.
- Oliveira, J.R., Castro, V.C., Vilela, P.G.F., Camargo, S.E., Carvalho, C.A., Jorge, A.O., Oliveira, L.D., 2013. Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry. *BMC Complement. Altern. Med.* 13, 208.

- Oliveira, R.G., Mahon, C.P., Ascêncio, P.G., Ascêncio, S.D., Balogun, S.O., Martins, D.T.O., 2014b. Evaluation of anti-inflammatory activity of hydroethanolic extract of *Dilodendron bipinnatum* Radlk. J. Ethnopharmacol. 155 (1), 387-395.
- Ozçelik, B., Kartal, M., Orhan, I., 2011. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. Pharm. Biol. 49 (4), 396-401.
- Pavan, F.R., Sato, D.N., Higuchi, C.T., Santos, A.C.B., Vilegas, W., Leite, C.Q., 2009. *In vitro* anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of some Brazilian "Cerrado" plants. Rev. Bras. Farmacogn. 19 (1), 204-206.
- Pemmeraju, S.C., Pruthi, P.A., Prasad, R., Pruthi, V., 2016. Modulation of *Candida albicans* Biofilm by Different Carbon Sources. Mycopathologia.
- Pfaller, M.A., Moet, G.J., Messer, S.A., Jones, R.N., Castanheira, M., 2011. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009. Antimicrob. Agents. Chemother. 55 (2), 561-566.
- Pinelii, L.A.P., Montandon, A.A., Corbi, S.C., Moares, T.A., Fais, L.M., 2013. Ricinus communis treatment of denture stomatitis in institutionalised elderly. J. Oral. Rehabil. 40 (5), 375-380.
- Pinho, E., Ferreira, I.C., Barros, L., Carvalho, A.M., Soares, G., Henriques, M., 2014. Antibacterial potential of northeastern Portugal wild plant extracts and respective phenolic compounds. BioMed Res Int. 2014, 1-8.
- Rashed, K., Butmariu, M., 2014. Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Bauhinia racemosa* Lam. and Chemical Content. Iran. J. Pharm. Res. 13 (3), 1073-1080.
- Rengarajan, T., Nandakumar, N., Balasubramanian, M.P., 2012. D-Pinitol a low-molecular cyclitol prevents 7,12-Dimethylbenz [α] anthracene induced experimental breast cancer through regulating anti-apoptotic protein Bcl-2, mitochondrial and carbohydrate key metabolizing enzymes. Biomedicine and Preventive Nutrition. 2, 25-30.
- Santos, B.L., Silva, A.R., Pitanga, B.P., Sousa, C.S., Grangeiro, M.S., Fragomeni, B.O., Coelho, P.L., Oliveira, M.N., Menezes-Filho, N.J., Costa, M.F., El-Bachá, R.S., Velozo, E.S., Sampaio, G.P., Freire, S.M., Tardy, M., Costa, S.L., 2011. Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin on human glioblastoma cells. Food Chem. 127 (2): 404-411.
- Santos, A.L.S., Braga-Silva, L.A., 2013. . Aspartic Protease Inhibitors: Effective Drugs against the Human Fungal Pathogen *Candida albicans*. Mini Rev Med Chem. 13, 155-162.
- Sardi, J.C., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A.M., Mendes Giannini, M.J., 2013. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation. J. Med. Microbiol. 62 (Pt 1), 10-24.

- Sethi, G., Ahn, K.S., Sung, B., Bharat, B., Aggarwal, B., 2008. Pinitol targets nuclear factor-KB activation pathway leading to inhibition of gene products associated with proliferation, apoptosis, invasion, and angiogenesis. *Mol Cancer Ther.* 7 (6), 1604–1614.
- Seneviratne, C.J., Silva, W.J., Jin, L.J., Samaranayake, Y.H., Samaranayake, L.P., 2009. Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Arch. Oral Biol.* 54 (11), 1052-1060.
- Shoemaker, R.H., 2006. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat. Rev. Cancer* 6 (10), 813-823.
- Silva, M.J.D., Endo, L.H., Dias, A.L.T., Silva, G.A., Santos, M.H., Silva, M.A., 2012a. Assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of the organic extracts and fractions of *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Mimosaceae). *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl* 33 (2), 267-274.
- Silva, M.S.P.S., Brandão, D.O., Chaves, T.P., Formiga Filho, A.L.N., Costa, E.M.M.B., Medeiros, A.C.D., 2012b. Study bioprospecting of medicinal plant extracts of the semiarid northeast: contribution to the control of oral microorganisms. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2012, 6p.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Williams, D.W., Azeredo, J., 2012c. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 36 (2), 288-305.
- Silva, W.J., Seneviratne, J., Parahitiyawa, N., Rosa, E.A., Samaranayake, L.P., Del Bel Cury, A.A., 2008. Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms. *Braz. Dent. J.* 19 (4), 364-369.
- Silva, W J., Seneviratne, J. Samaranayake, L.P. Del Bel Cury, A.A., 2010. Bioactivity and architecture of *Candida albicans* biofilms developed on poly (methyl methacrylate) resin surface. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 94 (1), 149-156.
- Singh, G., Passari, A.K., Leo, V.V., Mishra, V.K., Subbarayan, S., Singh, B.P., Kumar, B., Kumar, S., Gupta, V.K., Lahlhenmawia, H., Nachimuthu, S.K., 2016. Evaluation of Phenolic Content Variability along with Antioxidant, Antimicrobial, and Cytotoxic Potential of Selected Traditional Medicinal Plants from India. *Front. Plant Sci.* 7, 12p.
- Sosinska, G.J., Koning, L.J., Groot, P.W., Manders, E.M., Dekker, H.L., Hellingwerf, K.J., Koster, C.G., Klis, F.M., 2011. Mass spectrometric quantification of the adaptations in the wall proteome of *Candida albicans* in response to ambient pH. *Microbiology* 157 (Pt 1), 136-146.
- Suffness, M., Pezzuto, J.M., 1990. Assays related to cancer drug discovery, in: Hostettmann, K. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*. Academic Press, London pp. 71–133.
- Su, K.Y., Yu, C.Y., Chen, Y.P., Chen, Y.L., 2014. 3,4-Dihydroxytoluene, a metabolite of rutin, inhibits inflammatory responses in lipopolysaccharide-activated macrophages by reducing the activation of NF-κB signaling. *BMC Complement Altern Med.* 14, 21.

- Sugata, M., Lin, C., Shih, Y., 2015. Anti-Inflammatory and Anticancer Activities of Taiwanese Purple-Fleshed Sweet Potatoes (*Ipomoea batatas* L. Lam) Extracts. *Biomed Res. Int.* 2015, 10p.
- Tan, W.S., Arulselvan, P., Karthivashan, G., Fakurazi, S., 2015. *Moringa oleifera* Flower Extract Suppresses the Activation of Inflammatory Mediators in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Macrophages via NF- κ B Pathway. *Mediators Inflamm.* 2015, 11p.
- Tatsimo, S.J., Tamokou, J.D., Havyarimana, L., Csupor, D., Forgo, P., Hohmann, J., Kuate, J.R., Tane, P., 2012. Antimicrobial and antioxidant activity of kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum*. *BMC Res Notes*, 5,158.
- Tsang, C.S., Ng, H., McMillan, A.S., 2007. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* biofilms on titanium discs with different surface roughness. *Clin. Oral. Investig.* 11 (4), 361-368.
- Tu, L.Y., Bai, H.H., Cai, J.Y., Deng, S.P., 2016. The mechanism of kaempferol induced apoptosis and inhibited proliferation in human cervical cancer SiHa cell: From macro to nano. *Scanning*.
- Veza, T., Rodríguez-Nogales, A., Algieri, F., Utrilla, M.P., Rodrigues-Cabezas, M.E., Galvez, J., 2016. Flavonoids in Inflammatory Bowel Disease: A Review. *Nutrients* 8 (4), 22p.
- Vylkova, S., Carman, A.J., Danhof, H.A., Collette, J.R., Zhou, H., Lorenz, M.C., 2011. The fungal pathogen *Candida albicans* autoinduces hyphal morphogenesis by raising extracellular pH. *MBio* 2 (3), 00055-11.
- Warat, M., Sadowski, T., Szliska, E., Król, W., Czuba, Z.P., 2015. The Role of Selected Flavonols in Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor-1 (TRAIL-R1) Expression on Activated RAW 264.7 Macrophages. *Molecules*. 20 (1), 900-912.
- Williamson, J.D., Jennings, D.B., Guo, W., Pharr, D.M., 2002. Sugar alcohols, salt stress and fungal resistance: polyols—multifunctional plant protection? *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 127 (4), 467-473.
- Yang, Y.I., Shin, H.C., Kim, S.H., Park, W.Y., Lee, K.T., Choi, J.H., 2012. 6,6'-Bieckol, isolated from marine alga *Ecklonia cava*, suppressed LPS-induced nitric oxide and PGE₂ production and inflammatory cytokine expression in macrophages: the inhibition of NF κ B. *Int. Immunopharmacol.* 12 (3), 510-517.
- Zhan, T., Lou, H., 2007. Synthesis of azole nucleoside analogues of D-pinitol as potential antitumor agents. *Carbohydr Res.* 342 (6), 865–869.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados apontam o extrato das folhas da *Guapira graciliflora* Mart. como possível fonte de substâncias para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, voltados ao tratamento da candidíase. Porém, torna-se necessária a investigação de outras propriedades biológicas, como os mecanismos de ação sobre os fatores de virulência e toxicidade. Assim como, a realização de estudos para identificação do seu potencial terapêutico, viabilizando o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas. A investigação de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da candidíase é necessária, especialmente aquelas causadas por espécies não-*albicans*, uma vez que sua incidência nas últimas décadas tem gerado impacto negativo na saúde pública, com significativo índice de mortalidade, especialmente em pacientes imunocomprometidos

REFERÊNCIAS GERAIS

- ABE, F.; USUI, K.; HIRAKI, T. Fluconazole modulates membrane rigidity, heterogeneity, and water penetration into the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, v. 48, n. 36, p. 8494–8504, 2009.
- ABDOLLAHZADEH, S. H.; MASHOUF, R. Y.; MORTAZAVI, H. Antibacterial and antifungal activities of *Punica granatum* peel extracts against oral pathogens. *Journal of Dentistry (Tehran)*, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2011.
- AGRA, M. F. et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of ‘Cariri Paraibano’. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 111, n. 2, p. 383-95, 2007.
- AGRA, M. F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.
- AKINPELU, D. A. et al. Evaluation of Antibacterial and Antifungal Properties of *Alchornea laxiflora* (Benth.) Pax. & Hoffman. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2015, p. 1-6, 2015.
- ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal and magic plants from a public market in Northeastern. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 110, n. 1, p. 76-91, 2007.
- AL-DHAHERI, R. S.; DOUGLAS, L. J. Apoptosis in *Candida* biofilms exposed to amphotericin B. *Journal of Medical Microbiology*, v. 59, n. 2, p. 149–157, 2010.
- ARAÚJO, T. A. S. et al. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 120, n. 1, p. 72-80, 2008.
- BAGLA, V. P. et al. Antimicrobial activity, toxicity and selectivity index of two biflavonoids and a flavone isolated from *Podocarpus henkelii* (Podocarpaceae) leaves. *BMC Complement Alternative Medicine*, v. 14, n. 383, p. 1-6, 2014.
- BEECHER, G. R. Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature Occurrence and Intake. *The Journal of Nutrition*, v. 133, n. 10, p. 3248-3254, 2003.
- BRITTO, A. C. A. et al. *In Vitro* and *In Vivo* Antitumor Effects of the Essential Oil from the Leaves of *Guatteria friesiana*. *Planta Medica*, v. 78, n. 5, p. 409-414, 2012.
- CABEZON, V. et al. Apoptosis of *Candida albicans* during the interaction with murine macrophages: Proteomics and cell death marker monitoring. *Journal of Proteome Research*, v. 6, 2016.
- CANNON, R. D.; LAMPING, E.; HOLMES, A. R. Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 22, n. 2, p. 291–321, 2009.
- CARRILO-MUÑOZ, A. J. et al. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Revista Espanola de Quimioterapia*, v. 19, n. 2, p. 130–139, 2006.

- CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 131, n. 2. P. 326-342, 2010.
- CARVALHO, D. D. C. et al. Plant extracts to control *Alternaria alternata* in Murcott tangor fruits. *Revista Iberoamericana de Micologia*, v. 28, n. 4, p. 173–178, 2011.
- CASAGRANDE, J. C. et al. Antioxidant and Cytotoxic Activity of Hydroethanolic Extract from *Jacaranda decurrens* Leaves. *Plos One*, v. 9, n. 11, 2014.
- CAVALCANTI, Y. W. et al. Virulence and pathogenicity of *Candida albicans* is enhanced in biofilms containing oral bacteria. *Biofouling*, v. 31, n. 1, p. 27-38, 2015.
- CHANDRA, J. et al. Antifungal Resistance of Candidal Biofilms Formed on Denture Acrylic *in vitro*. *Journal of Dental Research*, v. 80, n. 3, p. 903-908, 2001.
- CHAVES, T. P. et al. Seasonal variation in the production of secondary metabolites and antimicrobial activity of two plant species used in Brazilian traditional medicine. *African Journal of Biotechnology*, v. 12, n. 8, p. 847-853, 2013.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. M27-A3, v. 28, n. 14, 2008.
- COELHO, F. B. R. et al. Levantamento etnofarmacológico realizado na comunidade Mumbuca localizada no Jalapão – TO. *Revista Eletrônica de Farmácia.*, v. 2, n. 2, p. 52-55, 2005.
- CONORADO-CASTELLOTE, L.; JIMÉNES-SORIANO, Y. Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. *J Clin Exp Dent*, v. 5, n. 5, p. 279-286, 2013.
- 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.
- COSTA, L. S. et al. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and chemical composition of extracts from the leaves and stem of *Chresta sphaerocephala*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 25, n. 4, p. 369-374, 2015.
- CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. New Horizons for Old Drugs and drug Leads. *Journal of Natural Products*, v. 77, p. 703-723, 2014.
- CUI, S. et al. Regulation of *Candida albicans* Interaction with Macrophages through the Activation of HOG Pathway by Genistein. *Molecules*, v. 21, n. 2, p. 1-11, 2016.
- DZOYEM, J. P. et al. Cytotoxicity, nitric oxide and acetylcholinesterase inhibitory activity of three limonoids isolated from *Trichilia welwitschii* (Meliaceae). *Biological Research*, v. 48, n. 57, p. 1-6, 2015.
- ERWIG, L. P.; GOW, N. A. R. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nature Reviews Microbiology*, v. 14, n. 3, p. 163-176, 2016.

- FERNANDEZ-ARENA, E. et al. *Candida albicans* actively modulates intracellular membrane trafficking in mouse macrophage phagosomes. *Cellular Microbiology*, v. 11, n. 4, p. 560-589, 2009.
- FERREIRA, G. L. S. et al. 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, 8 p, 2015.
- FIDEL, P. L. *Candida*-host interactions in HIV disease: relationships in oropharyngeal candidiasis. *Advances in Dental Research*, v.19, n. 1, p. 80-84, 2011.
- FREIRES, I. A. et al. *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, n. 6, p. 1-13, 2014.
- FREIRES, I. A. et al. The Effect of Essential Oils and Bioactive Fractions on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* Biofilms: A Confocal Analysis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2015, p. 1-9, 2015.
- FREITAS-FERNANDES, F. S. et al. 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. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, v. 112, n. 6, p. 1349-55, 2014.
- GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Comparative study on antimicrobial activity of some native tree extracts. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 72, n. 3, p. 353-358, 2005.
- GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*, v. 5, n. 12, p. 953-964, 2005.
- GOW, N. A. R. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nature Reviews Microbiology*, v. 10, n. 2, p. 112-122, 2011.
- GUPTA, A. K.; RYDER, J. E.; COOPER, E. A. Naftinina: a review. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, v. 12, n. 2, p.51-58, 2008.
- HANI, U. et al. Candidiasis: A Fungal Infection- Current Challenges and Progress in Prevention and Treatment. *Infectious Disorders Drug Targets*, v. 15, n. 1, p. 42-52, 2015.
- HOLETZ, F. B. et al. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.
- HUR, S. L. et al. Review of natural products actions on cytokines in inflammatory bowel disease. *Nutrition Research*, v. 32, n. 11, p. 801-816, 2012.
- JANG, M. et al. Extraction Optimization for Obtaining *Artemisia capillaris* Extract with High Anti-Inflammatory Activity in RAW 264.7 Macrophage Cells. *BioMed Research International*, v. 2015, p. 1-9, 2015.

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

KABIR, M. A.; AHMAD, Z. *Candida* Infections and Their Prevention. *ISRN Preventive Medicine*, v. 2013, p. 1-13, 2013.

KRUPPA, M. et al. The role of the *Candida albicans* histidine kinase [CHK1) gene in the regulation of cell wall mannan and glucan biosynthesis. *FEMS Yeast Research*, v. 3, n. 3, p. 289-299, 2003.

KUREK, A. et al. Modulation of antibiotic resistance in bacterial pathogens by oleanolic acid and ursolic acid. *Phytomedicine*, v. 19, n. 6, p. 515– 519, 2012.

LIMA, R. F. et al. Antimicrobial and Antiproliferative Potential of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2014, p. 1-7, 2014.

LINS, R. et al. Clinical evaluation of mouthwash with extracts from aroeira (*Schinus terebinthifolius*) and chamomile (*Matricaria recutita* L.) on plaque and gingivitis. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.*, v. 15, n. 1, p. 112-120, 2013.

MARTINEZ-SOLANO, L. et al. Proteomics of RAW 264.7 macrophages upon interaction with heat-inactivated *Candida albicans* cells unravel an anti-inflammatory response. *Journal of Proteomics*, v. 9, n. 11, p. 2995-3010, 2009.

MATHE, L.; VAN DIJCK, P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance. *Current Genetics*, v. 59, n. 4, p. 251-261, 2013.

MATSUMORI, N. et al. Direct interaction between amphotericin B and ergosterol in lipid bilayers as revealed by 2H NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, v. 131, n. 33, p. 11855–11860, 2009.

MOEN, M. D. et al. Liposomal amphotericin B: a review of its use as empirical therapy in febrile neutropenia and in the treatment of invasive fungal infections. *Drugs*, v. 69, n. 3, p. 361–392, 2009.

MONKS, A. et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 83, n. 11, p. 757-766, 1991.

MORSCHHÄUSER, J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, v. 47, n. 2, p.94–106, 2010.

NETT, J. E. et al. Interface of *Candida albicans* biofilm matrix-associated drug resistance and cell wall integrity regulation. *Eukaryotic Cell*, v. 10, n. 12, p. 1660-1669, 2011.

OLIVEIRA, L. F.; JORGE, A. O.; SANTOS, S. S. In vitro minocycline activity on superinfecting microorganisms isolated from chronic periodontitis patients. *Brazilian Oral Research*, v. 20, n. 3, p. 202-206, 2006.

- OLIVEIRA, J. R. et al. Control of microorganisms of oral health interest with *Arctium lappa* L. (burdock) extract non-cytotoxic to cell culture of macrophages (RAW 264.7). *Archives of Oral Biology*, v. 59, n. 8, p. 808-814, 2014.
- OLIVEIRA, R. G. et al. Evaluation of anti-inflammatory activity of hydroethanolic extract of *Dilodendron bipinnatum* Radlk. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 155, n. 1, p.387-395, 2014.
- ORTEGA, M. et al. *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. *The Journal of Hospital Infection*, v. 77, n. 2, p. 157-161, 2011.
- PAPPAS, P. G. et al. NIAID Mycoses Study Group. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clinical Infectious Diseases*, v. 37, n. 5, p. 634-643, 2003.
- PAVAN, F. R. et al. *In vitro* anti-Mycobacterium tuberculosis activity of some brazilian “Cerrado” plants. *Revista Brasileira de Farmacologia*, v. 19, n. 1b, p. 2014-206, 2009.
- PELEG, A. Y.; HOGAN, D. A.; MYLONAKIS, E. Medically important bacterial–fungal interactions. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, p. 340-349, 2010.
- PEREIRA-CENCI, T. et al. Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. *Journal of Applied Oral Science*, v. 16, n. 2, p. 86-94, 2008.
- PEREIRA-CENCI, T. et al. Temporal changes of denture plaque microbiologic composition evaluated in situ. *Journal of Prosthodontics*, v. 23, n. 3, p. 239-242, 2010.
- PERLIN, D. S. Current perspectives on echinocandin class drugs. *Future Microbiology*, v. 6, n. 4, p. 441–457, 2011.
- PERLROTH, J.; CHOI, B. SPELLBERG, B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Medical Mycology*, v. 45, n. 4, p. 321-346, 2007.
- PFALLER, M. A. et al. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, n. 2, p. 561-566, 2011.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. L. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 20, n. 1, p. 133-163, 2007.
- PILATOVA, M. et al. *In vitro* antiproliferative and antiangiogenic effects of synthetic chalcone analogues. *Toxicology In Vitro*, v. 24, p. 1347-1355, 2010.
- QUINTANS, J. S. et al. Chemical Constituents and Anticancer Effects of the Essential Oil from Leaves of *Xylopia laevigata*. *Planta Medica*, v. 79, n. 2, p. 123-130, 2013.

- REALES-CALDERON, J. A. et al. *Candida albicans* induces pro-inflammatory and anti-apoptotic signals in macrophages as revealed by quantitative proteomics and phosphoproteomics. *Journal of Proteomics*, v. 91, p. 106-135, 2013.
- REALES-CALDERON, J. A. et al. Proteomic characterization of human proinflammatory M1 and anti-inflammatory M2 macrophages and their response to *Candida albicans*. *Journal of Proteomics*, v. 14, n. 12, p. 1503-1518, 2014,
- REALES-CALDERON, J. A. et al. Sub-proteomic study on macrophage response to *Candida albicans* unravels new proteins involved in the host defense against the fungus. *Journal of Proteomics*, v. 75, n. 15, p. 4734-4746, 2012.
- RINALDO, D. et al. New Flavone from the Leaves of *Neea theifera* (Nyctaginaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 18, n. 6, p. 1132-1135, 2007.
- ROCHA, E. A. L. S. S. et al. Potencial antimicrobiano de seis plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 34, n. 3, 2013.
- RODEIRO, I. et al. Evaluation of the genotoxic potential of *Mangifera indica* L. extract (Vimang), a new natural product with antioxidant activity. *Food and Chemical Toxicology*, v. 44, n. 10, p. 1707-1713, 2006.
- SANTOS, A. L. S.; BRAGA-SILVA, L. A. Aspartic Protease Inhibitors: Effective Drugs against the Human Fungal Pathogen *Candida albicans*. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 13, p. 155-162, 2013.
- SANTOS, A. L. S. HIV aspartyl protease inhibitors as promising compounds against *Candida albicans*. *World Journal of Biological Chemistry*, v. 1, n. 2, p. 21-30, 2010.
- SARDI J. C. et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation. *Journal of Medical Microbiology*, v. 62, p. 10-24, 2013.
- SEIDER, K. et al. Interaction of pathogenic yeasts with phagocytes: survival, persistence and escape. *Current Opinion in Microbiology*, v. 13, n. 4, p. 392-400, 2010.
- SEVERI, J. A. Oleanane Saponins and Glycerogalactolipid from the Leaves of *Guapira graciliflora*. *Helvetica Chimica Acta*, v. 93, p. 1058-1066, 2010.
- SHOEMAKER, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nature reviews Cancer*, v. 6, n. 10, p. 813-823, 2006.
- SILVA, M. S. P. S. et al. Study bioprospecting of medicinal plant extracts of the semiarid northeast: contribution to the control of oral microorganisms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2012, 2012a.
- SILVA, W. J. et al. Bioactivity and architecture of *Candida albicans* biofilms developed on poly(methyl methacrylate) resin surface. *Journal of Biomedical Materials Research Applied Biomaterials*, v. 94, n. 1, p. 146-56, 2010.

SILVA, S. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 36, p. 288-305, 2012b.

SIQUEIRA, C. F. Q. et al. Levels of Tannins and Flavonoids in Medicinal Plants: Evaluating Bioprospecting Strategies. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2012, p. 1-7, 2012.

SKEHAN, P. et al. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SOUZA, R. F. et al. Interventions for cleaning dentures in adults. *Cochrane Database Systematic Reviews*, v. 7, n. 4, 2009.

STINTZING, F. C. et al. Betacyanins and phenolic compounds from *Amaranthus spinosus* L. and *Boerhavia erecta* L. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, v. 59, n. 1-2, p. 1-8, 2004.

SUGATA, M.; LIN, C.; SHIH, Y. Anti-Inflammatory and Anticancer Activities of Taiwanese Purple-Fleshed Sweet Potatoes (*Ipomoea batatas* L. Lam) Extracts. *BioMed Research International*, v. 2015, p. 1-10, 2015.

TAN, W. S. et al. *Moringa oleifera* Flower Extract Suppresses the Activation of Inflammatory Mediators in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Macrophages via NF- κ B Pathway. *Mediators of Inflammation*, v. 2015, p. 1-11, 2015.

TELES, F. R. et al. Comparison of microbial changes in early redeveloping biofilms on natural teeth and dentures. *Journal of Periodontology*, v. 83, n. 9, p. 1139-1148, 2012.

THIELE, M. C. et al. The role of candidal histolytic enzymes on denture-induced stomatitis in patients living in retirement homes. *Gerodontology*, v. 25, n. 4, p. 229-36, 2008.

TOLEDO, C. E. M. et al. Antifungal Properties of Crude Extracts, Fractions, and Purified Compounds from Bark of *Curatella Americana* L. (Dilleniaceae) against *Candida* Species. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2015, p. 1-9, 2015.

TSUI, C.; KONG, E. F.; JABRA-RIZK, M. A. Pathogenesis of *Candida albicans* Biofilm. *Pathogens and Disease*, p. 1-51, 2016.

VARGAS, F. S. et al. Antioxidant activity and peroxidase inhibition of Amazonian plants extracts traditionally used as anti-inflammatory. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 16, n. 1, 2016.

WILLIAMS, D. W. et al. *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontology 2000*, v. 55, n. 1, p. 250-265, 2011.

WILLIAMS, D.; LEWIS, M. Pathogenesis and treatment of oral. *Journal of Oral Microbiology*, v. 3, p. 1-8, 2011.

WISPLINGHOFF, H. et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Diseases*, v. 39, n. 3, p. 309-317, 2004.

WONG, S. S. W. et al. *In Vitro* and *In Vivo* Activity of a Novel Antifungal Small Molecule against *Candida* Infections. *Plos One*, v. 9, n. 1, p. 1-17, 2014.

ZAKARIA, Z. A. et al Antiproliferative and Antioxidant Activities and Total Phenolic Contents of the Extracts of *Melastoma malabathricum* Leaves. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, v. 4, n. 4, p. 248-256, 2011.

ANEXO A – Normas do periódico Journal of Ethnopharmacology, Qualis A2

JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY

An Interdisciplinary Journal Devoted to Indigenous Drugs

ISSN: 0378-8741

AUTHOR INFORMATION PACK.

DESCRIPTION

The *Journal of Ethnopharmacology* publishes original articles concerned with the observation and experimental investigation of the biological activities of plant and animal substances used in the traditional medicine of past and present cultures. The journal will particularly welcome interdisciplinary papers with an **ethnopharmacological**, an **ethnobotanical** or an **ethnochemical** approach to the study of indigenous drugs. Reports of **anthropological** and **ethnobotanical** field studies fall within the journal's scope. Studies involving **pharmacological** and **toxicological** mechanisms of action are especially welcome. Clinical studies on efficacy will be considered if contributing to the understanding of specific ethnopharmacological problems. The journal welcomes review articles in the above mentioned fields especially those highlighting the multi-disciplinary nature of ethnopharmacology. Commentaries are by invitation only.

AUDIENCE

Ethnopharmacologists, Medicinal Chemists, Pharmacologists, Toxicologists, Anthropologists, Pharmacognosists, Ethnobotanists, Economic Botanists, Ethnobiologists

IMPACT FACTOR

2014: 2.998 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015

ABSTRACTING AND INDEXING

AGRICOLA

BIOSIS

Cambridge Scientific Abstracts

Chemical Abstracts

Current Contents/Life Sciences

MEDLINE®

International Pharmaceutical Abstracts

EMBASE

NAPRALERT (Natural Products Alert)

Science Citation Index

CAB Abstracts

Scopus

EMBiology

GUIDE FOR AUTHORS

Types of paper

The *Journal of Ethnopharmacology* will accept the following contributions:

1. Original research articles - whose length is not limited and should include Title, Abstract, Methods and Materials, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements and

References. As a guideline, a full length paper normally occupies no more than 10 printed pages of the journal, including tables and illustrations.

2. Short Communications - whose average length is not more than 4 pages in print (approx. 2000-2300 words, including abstract and references). A maximum of 2 illustrations (figures or tables) is allowed. See paragraph below for description and format.

3. Letters to the Editors.

4. Reviews - Authors intending to write review articles should consult and send an outline to the Reviews Editor (see inside front cover for contact information) before preparing their manuscripts. The organization and subdivision of review articles can be arranged at the author's discretion. Authors should keep in mind that a good review sets the trend and direction of future research on the subject matter being reviewed. Tables, figures and references are to be arranged in the same way as research articles in the journal. Reviews on topics that address cutting-edge problems are particularly welcome. Outlines for potential reviews need to include: A detailed abstract using the structure provided in the guidelines An annotated table of contents A short CV of the lead author

5. Book reviews - Books for review should be sent to the Reviews Editor.

6. Commentaries - *invited*, peer-reviewed, critical discussion about crucial aspects of the field but most importantly methodological and conceptual-theoretical developments in the field and should also provide a standard, for example, for pharmacological methods to be used in papers in the *Journal of Ethnopharmacology*. The scientific dialogue differs greatly in the social / cultural and natural sciences, the discussions about the common foundations of the field are ongoing and the papers published should contribute to a transdisciplinary and multidisciplinary discussion. The length should be a maximum of 2-3 printed pages or 2500 words. Please contact the Reviews Editor j.ethnopharmacol@pharmacy.ac.uk with an outline.

7. Conference announcements and news.

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <https://www.elsevier.com/publishingethics> and <https://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Policy and ethics

In the covering letter, the author must also declare that the study was performed according to the international, national and institutional rules considering animal experiments, clinical studies and biodiversity rights. See below for further information. The ethnopharmacological importance of the study must also be explained in the cover letter.

Animal and clinical studies - Investigations using experimental animals must state in the Methods section that the research was conducted in accordance with the internationally accepted principles for laboratory animal use and care as found in for example the European Community guidelines (EEC Directive of 1986; 86/609/EEC) or the US guidelines (NIH publication #85-23, revised in 1985). Investigations with human subjects must state in the Methods section that the research followed guidelines of the Declaration of Helsinki and Tokyo for humans, and was approved by the institutional human experimentation committee or equivalent, and that informed consent was obtained. The Editors will reject papers if there is any doubt about the suitability of the animal or human procedures used.

Biodiversity rights - Each country has its own rights on its biodiversity. Consequently for studying plants one needs to follow the international, national and institutional rules concerning the biodiversity rights.

Author contributions

For each author the contribution to the publication should be mentioned.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <https://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/supporthub/publishing.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <https://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <https://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information about this can be found here: <https://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <https://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <https://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <https://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <https://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <https://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <https://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Glossary

Please supply, as a separate list, the definitions of field-specific terms used in your article.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- ***Author names and affiliations.*** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The author should divide the abstract with the **headings *Ethnopharmacological relevance, Aim of the study, Materials and Methods, Results, and Conclusions.***

Keywords

After having selected a classification in the submission system, authors must in the same step select 5 keywords. These keywords will help the Editors to categorize your article accurately and process it more quickly. A list of the classifications and set keywords can be found here. In addition, you can provide a maximum of 6 specific keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Chemical compounds

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect. You can include up to 10 names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the PubChem CID of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). The PubChem CIDs can be found via <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>. Please position the list of compounds immediately

below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the exact text formatting as in the example below:

Chemical compounds studied in this article

Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164); Benzalkonium chloride

(PubChem CID: 15865)

More information is available at: <https://www.elsevier.com/PubChem>.

Plant names

In the Materials and Methods section there must be a separate heading for describing the material used. That includes official name, local name, English name (if known), GPS position in case of collection in the wild or cultivation, a voucher specimen must be deposited in an official herbarium for possible future comparison. In the text it should be stated that the plant name has been checked with www.theplantlist.org mentioning the data of accessing that website.

In case of commercially procured material should mention the source, batch number, quality control data. Data on chemical characterization (metabolomics, chromatographic methods) should also be presented, in case of known active compounds their quantitative analysis should be presented.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.

- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Please note that figures and tables should be embedded in the text as close as possible to where they are initially cited. It is also mandatory to upload separate graphic and table files as these will be required if your manuscript is accepted for publication.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations

are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with "Unpublished results". "*Personal communication*" will not be accepted as a reference. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <http://dx.doi.org/10.1029/2001JB000884i>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/journal-of-ethnopharmacology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13.03.03).

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.