



Fabiana Paganotti Roque

**“ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO DA FRAÇÃO  
OBTIDA DO ÓLEO DE *PTERODON PUBESCENS* CONTRA  
*CANDIDA SPP.*, *STREPTOCOCCUS MUTANS*,  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E BIOFILME DE *CANDIDA  
ALBICANS*”.**

Piracicaba  
2013





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

**FABIANA PAGANOTTI ROQUE**

“ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO DA FRAÇÃO  
OBTIDA DO ÓLEO DE *PTERODON PUBESCENS* CONTRA  
*CANDIDA SPP.*, *STREPTOCOCCUS MUTANS*,  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E BIOFILME DE *CANDIDA*  
*ALBICANS*”.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestra em Biologia Buco-Dental área de concentração em Microbiologia e Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. José Francisco Höfling  
Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Mary Ann Foglio

Este exemplar corresponde à  
versão final da Dissertação de  
Mestrado defendida pela aluna Fabiana  
Paganotti Roque e orientada pelo Prof.  
Dr. José  
Francisco Höfling.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Orientador

PIRACICABA

2013

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba  
Marilene Girello - CRB 8/6159

R685a Roque, Fabiana Paganotti, 1984-  
Atividade antimicrobiana in vitro da fração obtida do óleo de *Pterodon pubescens* contra *Candida* spp., *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e biofilme de *Candida albicans* / Fabiana Paganotti Roque. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2013.

*Orientador: José Francisco Höfling.*

*Coorientador: Mary Ann Foglio.*

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. *Pterodon pubescens*. 2. Biofilme. 3. *Candida*. 4. *Staphylococcus aureus*. 5. *Streptococcus mutans*. I. Höfling, José Francisco, 1947-. II. Foglio, Mary Ann. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** In vitro antimicrobial activity of fraction of oil from *Pterodon pubescens* against *Candida* spp., *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* and *C. albicans* biofilm

**Palavras-chave em inglês:**

*Pterodon pubescens*

Biofilms

*Candida*

*Staphylococcus aureus*

*Streptococcus mutans*

**Área de concentração:** Microbiologia e Imunologia

**Titulação:** Mestra em Biologia Buco-Dental

**Banca examinadora:**

*José Francisco Höfling [Orientador]*

Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz

Janaína de Cássia Orlandi Sardi

**Data de defesa:** 01-11-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 01 de Novembro de 2013, considerou a candidata FABIANA PAGANOTTI ROQUE aprovada.

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Hofling".

---

Prof. Dr. JOSE FRANCISCO HOFLING

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Janaina de Cassia Orlandi Sardi".

---

Profa. Dra. JANAINA DE CASSIA ORLANDI SARDI

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Ana Lucia Tasca Gois Ruiz".

---

Profa. Dra. ANA LÚCIA TASCA GOIS RUIZ



## ABSTRACT

Research aimed at identifying and extracting compounds isolated from plants have been under a many years ago with the aim of discovering bioactive compounds and produce phyto due to the increased resistance of microorganisms to the antimicrobial commercially used. The action of bioactive compounds present in the seeds, bark, leaves and fruits of plants of the genus *Pterodon* spp. has been studied in bacteria, yeasts and protozoa, is related to antimicrobial, antiinflammatory, antiproliferative and against infection by *Schistosoma mansoni*. Yeasts of the genus *Candida* spp. and bacteria of the genus *Streptococcus* spp. and *Staphylococcus* spp. are associated with biofilm formation in medical devices, which is a strategy to resist antimicrobial agents and cells of the immune system. The compound FrB named, isolated from the seed oil *Pterodon pubescens* and identified by mass spectrometry with skeleton vouacapan, and the compounds geranylgeraniol, éster 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroxyvouacapan-17 $\beta$  oato de metila and ester 6 $\alpha$ -hidroxi-7 $\beta$ -acetoxi-vouacapan-17 $\beta$ -oate metil e acetoxi-7 $\beta$ - hidroxi-vouacapan-17 $\beta$ -oato metil were tested using the technique of minimal inhibitory concentration (MIC) in four species of *Candida* spp, and bacteria *Streptococcus mutans* and *Staphylococcus aureus*. Was observed MIC of 2 mg/mL to the four strains of *Candida* spp., although was not active against bacteria. By scanning and transmission electron microscopy, it was observed that FrB caused changes in the fungal cell wall. The diterpen vouacapan was tested on *Candida albicans* SC 5314 biofilm and there was a 70% inhibition of biofilm formation in a concentration of 1mg/mL. From the results obtained, we can affirm that diterpen skeleton with vouacapan, isolated from the seed oil of *Pterodon pubescens*, has antifungal activity and is a potential source for the production of plant based medicinal.

**Key words:** *Pterodon pubescens*. Biofilm. *Candida*. *Staphylococcus aureus*. *Streptococcus mutans*.

## RESUMO

Pesquisas que visam extrair e identificar compostos isolados de plantas tem sido levada a efeito há muitos anos, com o intuito de descobrir compostos com ação antimicrobiana e

produzir medicamentos devido ao aumento da resistência apresentada pelos microrganismos aos antimicrobianos disponíveis no mercado. A ação dos compostos presentes na semente, casca, folha e frutos das plantas do gênero *Pterodon* spp. tem sido estudadas em bactérias, leveduras e protozoários, estando relacionada à ação antimicrobiana, antiinflamatória, antiproliferativa e contra cercárias de *Schistosoma mansoni*. Leveduras do gênero *Candida* spp., bactérias do gênero *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. estão associadas à formação do biofilme em dispositivos médicos, sendo esta uma estratégia para resistir aos agentes antimicrobianos e às células do sistema imunológico. O composto denominado FrB, identificado através de espectrometria de massas com esqueleto vouacapano, e os compostos geranilgeraniol, éster 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -diidroxivouacapano-17 $\beta$  oato de metila e os isômeros éster 6 $\alpha$ -hidroxi-7 $\beta$ -acetoxi-vouacapano-17 $\beta$ -oato de metila e acetoxi-7 $\beta$ -hidroxi-vouacapano-17 $\beta$ -oato de metila, foram testados através da técnica de concentração inibitória mínima (CIM) em quatro espécies de *Candida* spp, e nas bactérias *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. Foi observada CIM de 2mg/mL apenas nas quatro cepas de *Candida* spp., não sendo ativo contra as bactérias. Através da microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, observou-se que FrB provocou modificações na parede celular fúngica. O composto diterpeno com esqueleto vouacapano foi testado no biofilme de *Candida albicans* SC 5314 e verificou-se uma inibição de 70% do biofilme em formação na concentração de 1mg/mL. No entanto, nenhum dos quatro compostos foram ativos contra bactérias. A partir dos resultados obtidos, podemos afirmar que o vouacapano, isolado do óleo da semente de *Pterodon pubescens*, apresenta atividade antifúngica, sendo uma potencial fonte para produção de medicamentos a base de plantas.

Palavras-chave: *Pterodon pubescens*. Biofilme. *Candida*, *Staphylococcus aureus*. *Streptococcus mutans*.



## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	xi
AGRADECIMENTOS	xiii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xv
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
3 PROPOSIÇÃO	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
5 RESULTADOS	31
6 DISCUSSÃO	48
7 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56



## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais Elcio e Vanda que sempre me deram todo o incentivo e amor incondicional, me ensinaram a persistir pelos meus sonhos e minha irmã Alexandra pela atenção e carinho.



## AGRADECIMENTOS

A Deus que ilumina e abençoa meus caminhos.

A minha família querida:

Minha mãe Vanda, meu pai Elcio e minha irmã Alexandra, que são a razão do meu viver e que eu amo muito.

Obrigada por terem me apoiado em todos os momentos da minha vida.

Ao meu querido namorado Juliano por todo o carinho, incentivo e compreensão em todos os momentos que precisei.

Ao meu orientador:

Prof. Dr. José Francisco Höfling

Por confiar em meu trabalho e me aceitar como sua aluna, pelos ensinamentos e por contribuir na minha formação profissional.

A minha coorientadora

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mary Ann Foglio pela orientação científica, pela paciência e amizade.

Aos professores da Microbiologia

prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Oliveira Mattos Graner e Prof. Dr. Rafael Nóbrega Stipp pelo apoio e ensinamentos.

A Paula Cristina Aníbal pelos ensinamentos e pela ajuda e apoio no meu trabalho.

Ao pessoal do laboratório de Microbiologia

Mariana, Flávia, Tarsila, Lívia, Simone, Ítalo, Manoel, Thaís, Giovana, Valéria, Érika, Marcele, pela amizade e momentos que passamos juntos.

A Núbia Cássia Almeida de Queiroz, do CPQBA, pela contribuição, pelos ensinamentos, paciência e amizade, e todo o pessoal do CPQBA, por me receberam com muito carinho e amizade.

As professoras Dr.<sup>a</sup> Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz e Dr.<sup>a</sup> Janaína de Cássia Orlandi Sardi por aceitarem participar da banca examinadora e contribuir com esse trabalho e aos suplentes Profs. Drs. Paula Cristina Aníbal e Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa por aceitarem este convite.

A Eliene e Adriano da Microscopia pela atenção e contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

A Renata Preté e Ivete que sempre estiveram disponíveis e ajudaram quando precisei.

Aos meus amigos e familiares, pessoas que indiretamente contribuíram para esse trabalho torcendo por mim.

À Faculdade de Odontologia e Universidade Estadual de Campinas pela oportunidade de aprendizagem e ensino.

Ao diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior.

A CAPES pelo apoio financeiro concedido pela bolsa de mestrado.

A FAPESP pelo financiamento deste trabalho processo n° 2011/50950-0.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Sementes de <i>Pterodon pubescens</i>	20
FIGURA 2 – Extração do óleo	21
FIGURA 3 - Coluna filtrante	22
FIGURA 4 – Cromatografia em Coluna Filtrante	23
FIGURA 5 – Placa de 96 poços	28
FIGURA 6 – Cromatografia em Camada Delgada das frações	31
FIGURA 7 – Perfil cromatográfico	32
FIGURA 8 – Perfil cromatográfico	32
FIGURA 9 - Estrutura química do diterpeno com esqueleto vouacapano	33
FIGURA 10 - Estrutura química éster $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapano- $17\beta$ oato de metila.	33
FIGURA 11 - Estrutura química do geranilgeraniol	33
FIGURA 12 - Estrutura química do éster $6\alpha$ -hidroxi- $7\beta$ -acetoxi-vouacapano- $17\beta$ -oato de metila e acetoxi- $7\beta$ - hidroxi-vouacapano- $17\beta$ -oato de metila.	34
FIGURA 13 – Repique dos poços	35
FIGURA 14 - Gráfico biofilme x diterpeno com esqueleto vouacapano	36
FIGURA 15 – Gráfico biofilme x geranilgeraniol	37
FIGURA 16 – Gráfico biofilme x éster $6\alpha$ -hidroxi- $7\beta$ -acetoxi-vouacapano- $17\beta$ -oato de metila e acetoxi- $7\beta$ - hidroxi-vouacapano- $17\beta$ -oato de metila	37
FIGURA 17 – Gráfico biofilme x éster $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapano- $17\beta$ oato de metila	38
FIGURA 18 – MEV de <i>C. krusei</i>	39
FIGURA 19 - MEV de <i>C. krusei</i>	39
FIGURA 20 - MEV de <i>C. krusei</i>	39
FIGURA 21 - MEV de <i>C. krusei</i>	39
FIGURA 22 - MEV de <i>C. albicans</i>	40

FIGURA 23 - MEV de <i>C. albicans</i>	40
FIGURA 24 - MEV de <i>C. albicans</i>	40
FIGURA 25 – MEV de <i>C. tropicalis</i>	41
FIGURA 26 – MEV de <i>C. tropicalis</i>	41
FIGURA 27 – MEV de <i>C. tropicalis</i>	41
FIGURA 28 – MEV de <i>C. tropicalis</i>	42
FIGURA 29 – MEV de <i>C. glabrata</i>	42
FIGURA 30 – MEV de <i>C. glabrata</i>	42
FIGURA 31 – MET de <i>C. glabrata</i>	42
FIGURA 32 – MET de <i>C. albicans</i>	43
FIGURA 33 – MET de <i>C. albicans</i>	43
FIGURA 34 – MET de <i>C. albicans</i>	44
FIGURA 35 – MET de <i>C. albicans</i>	44
FIGURA 36 – MET de <i>C. krusei</i>	44
FIGURA 37 – MET de <i>C. krusei</i>	44
FIGURA 38 – MET de <i>C. krusei</i>	45
FIGURA 39 – MET de <i>C. krusei</i>	45
FIGURA 40 – MET de <i>C. krusei</i>	45
FIGURA 41 – MET de <i>C. krusei</i>	46
FIGURA 42 – MET de <i>C. glabrata</i>	46
FIGURA 43 – MET de <i>C. glabrata</i>	46
FIGURA 44 – MET de <i>C. glabrata</i>	46
FIGURA 45 – MET de <i>C. glabrata</i>	47
FIGURA 46 – MET de <i>C. glabrata</i>	47



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Cromatografia em Coluna Filtrante	23
TABELA 2 – Cromatografia em Coluna Clássica	24
TABELA 3 – Cepas bacterianas	25
TABELA 4 – Cepas de leveduras	25
TABELA 5 – Resultado da leitura de CIM após 24 horas	34
TABELA 6 – Resultado da leitura de CIM após 48 horas	35



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI – Brain Heart Infusion

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CBS – Central Bureau voor Schimmelcultures

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – Clinical and Laboratory Standard Institute

CPQBA – Centro Pluridisciplinar de Pesquisa Química, Biológica e Agronômica

DMSO – Dimetil Sulfóxido

IZ – Instituto Zimotécnico ESALQ – USP

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MRSA – Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Solução Tampão de Salina Fosfatada

RPMI-1640 - meio de cultura para leveduras

SDA – Sabouraud Dextrose Ágar

XTT - (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5sulfo-fenil)-2H-tetrazolium-5-carboxanilida)

YPD- Yeast Peptone Dextrose



## INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas são uma das principais causas de morte no mundo (Vranakis *et al.*, 2013), sendo que as infecções fúngicas infectam bilhões de pessoas no mundo todos os anos (Brown *et al.*, 2012). A disseminação de microrganismos resistentes, levando a infecções não tratáveis, tem se tornado um problema à saúde pública e a descoberta de novos antibióticos diminuiu (Lewis, 2013).

Leveduras do gênero *Candida* são microrganismos comensais que colonizam a flora microbiana da cavidade oral, da pele, do trato gastrointestinal e urogenital de indivíduos saudáveis (Odds, 1988; Hube e Naglik, 2001). No entanto, em pacientes imunocomprometidos ou sob terapia antimicrobiana por longos períodos de tempo, essas leveduras podem tornar-se patogênicas, provocando doenças conhecidas como candidose (Dahlén, 2006; Spelberg *et al.*, 2006). A maioria da população é assintomaticamente colonizada por *C. albicans* e *C. glabrata*, ou por apenas uma delas (Li *et al.*, 2007).

*Candida albicans* tem um papel relevante no desencadeamento de infecções bucais, porém espécies consideradas patogênicas como *C. kefír*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. stellatoidea*, foram identificadas em casos de candidose bucal, principalmente em pacientes imunocomprometidos (Anaissie, 1992; Challacombe, 1994; Lynch, 1994). Doenças provocadas por *C. albicans* estão frequentemente associadas à formação de biofilme, que são comunidades bem estruturadas com a capacidade de resistir a agentes antimicrobianos e às células do sistema imune (Ramage *et al.*, 2001; Douglas, 2003). *Candida krusei* possuem resistência inata a muitas drogas a base de azóis como fluconazol, voriconazol, miconazol, itraconazol, cetoconazol e ravuconazol (Pfaller *et al.*, 2011).

Além disso, bactérias do gênero *Staphylococcus*, particularmente a espécie *S. aureus*, são reconhecidas como um dos maiores patógenos responsáveis por uma ampla incidência de infecções, desde moderadas infecções de pele até as mais agressivas bacteremias e septicemias (Hardy *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004).

Considerado o principal agente etiológico da cárie dental, *Streptococcus mutans* é encontrado no biofilme aderido à superfície dos dentes (Loesche, 1986;

Navarre e Schneewind, 1999; Napimoga *et al.*, 2004). Outras espécies de *Streptococcus* que pertencem ao grupo *mutans* são *S. sobrinus* e *S. downei* (Nobbs *et al.*, 2009).

Atualmente, o quadro geral de doenças infecciosas e o uso da terapia antimicrobiana é mais complicado, com bactérias resistentes a múltiplas drogas representando uma ameaça e fonte de preocupação mundial. Os microrganismos têm mostrado uma enorme capacidade de evoluir em direção a resistência (González-Zorn e Escudero, 2012).

Os problemas de resistência aos antibióticos e antifúngicos produzidos comercialmente, leva alternativamente ao desenvolvimento de pesquisas de plantas com atividade antimicrobiana e antifúngica para a produção de medicamentos que visam à redução de efeitos colaterais e a resistência dos microrganismos.

Popularmente, as plantas medicinais têm sido utilizadas com finalidade terapêutica, entretanto, a partir da década de 1970, a Organização Mundial da Saúde (OMS) incentivou o estudo científico dessas plantas, objetivando o conhecimento dos benefícios desses agentes medicinais e os riscos quando consumidos de forma exagerada. Diversos fatores têm colaborado com o desenvolvimento de práticas de saúde que incluem plantas medicinais, principalmente o baixo custo e o fácil manuseio (Almeida e Menezes, 2002).

No Brasil, um grande número de plantas têm sido utilizadas na forma de extrato bruto, infusões ou emplastos para tratar infecções comuns (Moraes *et al.*, 2005; Vendruscolo *et al.*, 2005; Tôrres *et al.*, 2005).

Diversos trabalhos realizados com a planta do gênero *Pterodon* tem sido realizados, com diferentes finalidades, como testes de atividade antiproliferativa (Euzébio *et al.*, 2009), anti-inflamatória (Carvalho *et al.*, 1999) e quimioprolifática (Fascio *et al.*, 1970; Mahjan e Monteiro, 1973).

O gênero *Pterodon* compreende cinco espécies nativas do Brasil: *P. pubescens* Benth, *P. apparicioni* Pedersoli, *P. abruptus* Benth, *P. polygalaeiflorus* Benth e *P. emarginatus* Vog. (Mors *et al.*, 1967). A espécie *Pterodon pubescens* é uma árvore nativa do Brasil, localizada principalmente na região do cerrado, conhecida popularmente como sucupira, faveiro ou sucupira-lisa. As propriedades antimicrobianas das substâncias presentes em extratos e óleos essenciais produzidos pelas plantas são reconhecidas através de pesquisas há muitos anos (Janssen *et al.*, 1987).

Extratos alcoólicos do fruto de *Pterodon* são utilizados na medicina popular como anti-reumático, anti-inflamatório (dor de garganta) e como analgésico (Correa, 1978). Estudos fitoquímicos com o gênero *Pterodon* demonstraram a presença de isoflavonas (Braz Filho *et al.*, 1970), diterpenóides no óleo da semente (Fascio *et al.*, 1976) e compostos como alcalóides (Torrenegra *et al.*, 1989). Apenas 10% dos compostos bioativos são isolados das plantas (Cowan, 1999; Lourenço, 2003), sendo necessários mais estudos.

Sendo assim, pesquisas que demonstrem a atividade antimicrobiana de *Pterodon pubescens* são importantes instrumentos para possibilitar o desenvolvimento de novas fontes de fármacos, que possam ser utilizados no combate aos microrganismos, muitos dos quais já são resistentes aos antimicrobianos comerciais em uso.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Plantas medicinais

Nos países em desenvolvimento, as doenças infecciosas são a principal causa de morte (York *et al.*, 2011). O tratamento das doenças infecciosas enfrenta um grande problema, devido ao desenvolvimento de resistências dos microrganismos aos antibióticos e antivirais amplamente utilizados (Chen *et al.*, 2011). As plantas medicinais tem tido um papel importante no descobrimento e desenvolvimento de drogas e são amplamente conhecidas como fonte de metabólitos antimicrobianos ativos (McGaw *et al.*, 2008).

As plantas representam fontes valiosas de produtos para a manutenção da saúde humana, tendo seu uso mais difundido especialmente nos últimos anos, após numerosos estudos com produtos terapêuticos oriundos de plantas medicinais, tornando-se foco de pesquisas científicas que visam à determinação de seus efeitos farmacológicos. Contudo, o uso oficial dessas fontes terapêuticas nos serviços de saúde requer o conhecimento científico para a transformação dessas plantas em fonte terapêutica de uso seguro, racional e benéfico (Rates, 2001; Michilis, 2004; Torres *et al.*, 2005; Vendruscolo *et al.*, 2005).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 1999) grande parte da população utiliza remédios tradicionais, principalmente advindos de plantas medicinais. Nos países em desenvolvimento, 65-80% da população depende exclusivamente das plantas medicinais para a saúde básica (Agra *et al.*, 2007). Em 1990, o interesse por drogas derivadas de plantas superiores, especialmente fitoterápicos, aumentou expressivamente. Shu (1998), verificou que cerca de 25% de todos os remédios eram derivados de plantas medicinais direta ou indiretamente.

Assim, óleos essenciais e seus componentes estão se tornando populares como agentes antimicrobianos para o uso em uma ampla variedade de propósitos, entre elas a preservação de alimentos na medicina complementar e terapêuticas naturais (Di Pasqua *et al.*, 2005).



## 2.2 Compostos isolados da planta do gênero *Pterodon*

A literatura relata uma diversidade de estudos sobre as propriedades medicinais de plantas, entre elas pesquisas com sementes, frutos, folha e caule da planta do gênero *Pterodon*. Em geral as árvores nativas dessa espécie são aromáticas, com cerca de 5 a 10 metros de altura, distribuída pela região central do Brasil (Dutra *et al.*, 2008). Segundo Suarez e Engleman (1980) as sementes maduras de algumas espécies tem uma característica distinta, que é a presença de compostos fenólicos no tegumento, que contribuem para a dureza, permeabilidade à água e resistência ao ataque de patógenos.

A diversidade química de metabólitos nas plantas se deve às pressões da natureza, entre elas o estresse abiótico, a fauna e os microrganismos que convivem no ambiente, sendo fatores relevantes na produção desses metabólitos (Hansen *et al.*, 2010).

Os constituintes químicos presente nas plantas podem apresentar variações, em relação a alguns fatores que influenciam no conteúdo dos metabólitos secundários, como a época em que é realizada a coleta, conhecido como variações sazonais, podendo alterar a quantidade e a natureza dos constituintes ativos, como o conteúdo de óleos essenciais (Schwob *et al.*, 2004), lactonas sesquiterpênicas (Zidorn *et al.*, 2001), ácidos fenólicos (Grace *et al.*, 1998), alcalóides (Elgorashi *et al.*, 2002), saponinas (Ndamba *et al.*, 1994) e taninos (Salminen *et al.*, 2001). Outro fator associado à produção de metabólitos é a idade e a fase de desenvolvimento da planta, pois tecidos mais novos possuem taxa biossintética maior de metabólitos (Hartmman, 1996), como óleos essenciais (Gershenzon *et al.*, 1989) e alcalóides (Hoft *et al.*, 1998). De acordo com Evans (1996) em temperaturas elevadas, a formação de óleos voláteis aumenta. Períodos de seca parecem ser importantes na concentração de metabólitos, dependendo do grau de estresse e do período em que ocorre, sendo que em curto prazo ocorre aumento da produção e, a longo prazo, ocorre a diminuição na produção de metabólitos secundários (Waterman e Mole, 1998). Uma mesma população de plantas indiferenciadas morfológicamente e sexualmente podem apresentar produções de óleos essenciais com composição química diferente (Gobbo-Neto *et al.*, 2007, Paula *et al.*, 2011).

Estudos com compostos isolados da semente, folha e frutos da planta do gênero *Pterodon*, como *P. pubescens*, *P. polygalaeflorus*, *P. emarginatus*, *P. appariciori* ocorrem há alguns anos. Seus constituintes fitoquímicos têm sido relacionados como potencial farmacológico para diversas doenças.

Alguns autores estudaram a ação quimioprolifática para esquistossomose de compostos isolados da planta *Pterodon*. Mors *et al.* (1967) isolou do óleo essencial do fruto de *P. pubescens*, o 14,15-epoxigeranilgeraniol, verificando que possuía atividade quimioprolifática em *Schistosoma mansoni* e Santos Filho *et al.* (1972) isolaram o 14-15-dihidroxigeranilgeraniol e verificaram que era responsável pela inibição da penetração das cercárias na pele.

Posteriormente, Santos Filho *et al.* (1972) elaboraram um sabonete contendo óleo essencial de *Pterodon pubescens* e verificaram que se aplicado 24 horas antes, tinha ação protetora contra infecção pela esquistossomose.

Outros compostos isolados como diterpenóides obtidos do óleo do fruto de *P. emarginatus* (Fascio *et al.*, 1970), posteriormente dois novos diterpenóides com esqueleto vouacapano de *P. emarginatus* (Mahajan & Monteiro, 1973) e dois terpenos de *Pterodon pubescens* (Fascio *et al.*, 1976) também possuíam atividade contra as cercárias.

Segundo Menna-Barreto *et al.* (2008), o composto extraído da semente de *P. pubescens*, geranilgeraniol inibiu a proliferação intracelular de formas amastigostas de *Trypanosoma cruzi*, em concentrações que não afetam as células dos mamíferos.

Estudos realizados com o extrato bruto hexânico do fruto da espécie *Pterodon emarginatus* Vog, descreveram a sua ação antinociceptiva (Duarte *et al.*, 1996; Silva *et al.* 2004) e anti-inflamatória do diterpeno vouacapano 6 $\alpha$ , 7 $\beta$  dihidroxivouacapano 17 oato (Carvalho *et al.*, 1999; Coelho *et al.*, 2005). Sabino *et al.* (1999) estudaram a ação do extrato hidroalcoólico de sementes de *Pterodon pubescens* e observaram uma redução significativa da artrite induzida pelo colágeno após tratamento preventivo via oral por um período prolongado.

Nunan *et al.* (1982) observaram diminuição do edema de pata de ratos induzido por carragenina, histamina e serotonina, provocado pela ação dos furoditerpenos de *P. polygalaeflorus* Benth.

A atividade antiproliferativa de 5 voucapanoides não-lactona foi estudada por Spindola *et al.* (2009), no qual foi isolado o óleo da semente de *P. pubescens*, sendo que três deles apresentaram bons resultados para linhagens de células de câncer de próstata. Segundo Menna-Barreto *et al.* (2008), o composto extraído da semente de *P. pubescens*, geranilgeraniol inibiu a proliferação intracelular de *Trypanosoma cruzi* amastigotas, em concentrações que não afetam as células dos mamíferos.

Euzébio *et al.* (2009) também verificaram a atividade antiproliferativa do composto 2-furoditerpeno em células de câncer de ovário. Por outro lado, Cardoso *et al.* (2008) observaram que o óleo de *P. pubescens* tem ação na resposta imune humoral e celular exacerbada de pacientes com doenças auto-imunes e doenças crônicas inflamatórias, suprimindo os linfócitos B e T.

Coelho *et al.* (2001), verificaram que não houve efeito tóxico sub-aguda do extrato hidroalcoólico em estudos histopatológicos, hematológico e clínico realizados através do modelo de artrite em camundongos.

Dutra *et al.* (2008), verificaram que os constituintes fenólicos presentes na semente de *P. emarginatus* possuem atividade antioxidante.

Estudos realizados por Bustamante *et al.* (2010), no qual utilizou-se o extrato etanólico bruto da casca de *Pterodon emarginatus*, relataram que a presença de flavonóides, heterosídeos saponínicos, resinas e traços de esteróides e triterpenóides no pó da casca apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas esporuladas e não-esporuladas, gram-negativas e contra a levedura *Candida albicans*.

Santos *et al.* (2010) testou a atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *P. emarginatus* e verificou moderada atividade antimicrobiana nas bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus roseus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus atropheus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus stearothermophilus* com concentração inibitória mínima variando de 0,72 a 50 mg/mL.

### 2.3 Leveduras do gênero *Candida*

Leveduras do gênero *Candida* são patógenos oportunistas frequentemente encontrados nos seres humanos e podem ser isolados entre 50 a 60% da cavidade oral dos adultos saudáveis, além de colonizar as superfícies do epitélio vaginal e intestinal (Samaranayake, 2002).

*Candida albicans* é a principal causa de dois tipos de infecção: infecções superficiais da pele e mucosa, e infecções invasivas, onde o fungo pode se disseminar pela corrente sanguínea e infectar os órgãos internos (Calderone, 2002).

A incidência global e a prevalência de candidose bucal podem ser atribuídas ao aumento do uso indiscriminado de antibióticos de amplo espectro, corticoesteróides e ao aumento de indivíduos imunossuprimidos na população, que apresentam desordens endócrinas e deficiências nutricionais (Samaranayake, 2009).

A espécie *C. albicans* é a mais comumente encontrada na cavidade bucal, sendo responsável por infecções fúngicas superficiais e sistêmicas (Davey, 2006). Isso ocorre devido à tolerância aos antifúngicos azóis comumente utilizados, como cetoconazol e fluconazol (Ruhnke, 2006; Wenzel, 1995). No entanto, espécies de *Candida* não-*albicans* como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis* e *C. krusei* são também isolados de sítios infecciosos (Weems, 1992). Dos isolados da corrente sanguínea de espécies de *Candida*, 18,3% é *C. glabrata* (Pfaller *et al.*, 2003). Entre as espécies de *Candida*, *C. albicans* e *C. glabrata* são as primeiras e segundas espécies mais isoladas, respectivamente, e ambas são responsáveis por 65-75% dos casos de candidose sistêmica, seguidas de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. (Perlroth *et al.*, 2007).

Os fungos usam várias estratégias para desencadear doenças e resistir aos mecanismos de defesa do hospedeiro, entre elas estão a adesão aos tecidos específicos, resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro e proliferação por certa extensão (Odds, 2000). Para sobreviver e colonizar o hospedeiro, os fungos possuem mecanismos de sensibilidade e resposta às mudanças no pH, oxidação, estresse osmótico, e limitações nutricionais (Roman *et al.*, 2007). Dessa forma, os fungos alcançam diferentes órgãos internos e tecidos provocando doenças coletivas, denominadas de

candidoses (Berman e Sudbery, 2002). A mudança morfológica de *C. albicans* tem um papel fundamental em aspectos da infecção (Sudbery, 2011).

A virulência de *Candida albicans* está atribuída, entre outras, à capacidade de crescer de diferentes formas vegetativas podendo ser leveduriformes, hifas e pseudo-hifas. Estudos sobre a capacidade das hifas de escapar de células fagocíticas e de se difundirem nos tecidos e sangue, sugerem que a morfologia é um fator que contribui para a sobrevivência de *C. albicans* em diferentes locais e condições (Brown, 2002; Bergman, 2006).

As formas de levedura e hifa diferem em relação a alguns atributos de virulência, como dinâmica de crescimento, na estrutura celular, padrão de expressão genética, moléculas de superfície celular, potencial de invasão e disseminação (Gow *et al.*, 2011). Outra característica que diferencia a forma de hifa da leveduriforme é o padrão de citocinas liberadas e de reconhecimento de células do sistema imune (Naglik *et al.*, 2003).

Leveduras da espécie *Candida* spp. possui mecanismos de virulência que são importantes durante a infecção. A adesão às células do hospedeiro é mediada por fatores de adesão, como proteínas da família Als, Hwp1 e Eap1, expressas na parede celular conhecidas como adesinas (Zordan & Cormack, 2012). Adesinas como Als3 e Hwp1 são expressas durante a formação da hifa que é importante na adesão de *Candida* às células do hospedeiro (Watchler *et al.*, 2011). Segundo Hoyer *et al.* (2008) as proteínas Als3 de *Candida albicans* têm várias funções, na adesão as células epiteliais, na aquisição da ferritina (Almeida *et al.*, 2008) e durante a formação do biofilme fúngico (Silverman *et al.*, 2010).

Após *C. albicans* se aderir às células epiteliais, a etapa seguinte é a penetração que pode ser realizada através de dois mecanismos: pela indução da endocitose pelas células do hospedeiro, através de proteínas que são expressas na superfície celular fúngica que se ligam aos receptores presentes na célula do hospedeiro, como a E-caderina nas células epiteliais e N-caderina nas células endoteliais, que desencadeiam o englobamento do fungo (Phan *et al.*, 2005; Phan *et al.*, 2007), ou através da penetração ativa através da hifa (Wächler *et al.*, 2012). Na penetração ativa, acredita-se que a hifa penetra no tecido através da combinação de forças físicas

exercidas pela extensão de filamentos e pela secreção de enzimas hidrolíticas (Wächler *et al.*, 2012).

Muitos microrganismos possuem enzimas hidrolítica que estão relacionadas com a virulência (Naglik *et al.*, 2003). As proteinases catalisam a hidrólise de ligações peptídicas em proteínas do hospedeiro (Barrett & Rawlings, 1991). A aspartil proteinase secretada, conhecida como SAP, é uma enzima hidrolítica extracelular produzida por *Candida* spp. (Sterh *et al.*, 2000) importante nas infecções da mucosa, sendo que a produção de SAP está associada com outros atributos de virulência entre eles a formação de hifa, a adesão e mudança fenotípica (Naglik *et al.*, 2003).

Mecanismos de *quorum sensing* são utilizados para comunicação entre os microrganismos. Em *C. albicans* as principais moléculas do *quorum sensing* são o farnesol, tirosol e o dodecanol, e quando há uma alta densidade celular, promovem o crescimento na forma leveduriforme; em baixa densidade celular ocorre o crescimento na forma de hifas, sendo esta importante para a invasão (Berman e Sudbery, 2002) e a leveduriforme para a disseminação nos tecidos dos hospedeiros (Saville *et al.*, 2003). Neil *et al.* (2012) através de análises histológicas observaram que o *quorum sensing* também regula a profundidade da invasão nos tecidos, através do controle da alteração entre as morfologias de levedura e hifa.

Alguns micronutrientes são necessários para *C. albicans* infectar o hospedeiro, como o ferro, que necessita de sistemas de aquisição (Almeida *et al.*, 2009). O ferro é um elemento essencial tanto para o hospedeiro quanto para *C. albicans*. A absorção de ferro durante o processo de infecção é considerado um fator de virulência, sendo que a colonização e a proliferação ocorrem somente se tiver ferro suficiente (Sutak, 2008). A obtenção de ferro pode ser de várias formas: através de um sistema redutor, sideróforos ou por um sistema heme de captação de ferro (Almeida *et al.*, 2009). No sistema redutor a aquisição de ferro é obtida através da ferritina, transferrina ou do ambiente, pela adesina Als3, que possui um receptor para ferritina (Almeida *et al.*, 2008). A obtenção do ferro através do sideróforo é realizada por *C. albicans* através desses componentes produzidos por outros microrganismos (Heymamm *et al.*, 2002). No sistema heme de captação de ferro, a aquisição do ferro é obtida da hemoglobina e de proteínas-heme (Almeida *et al.*, 2009; Weissman e Kornitzer, 2004).

Outro fator importante é a adaptação às mudanças metabólicas para a sobrevivência e crescimento de *Candida* spp. nos organismos vivos. Durante a candidose, o fungo que está na corrente sanguínea utiliza a glicose como fonte de nutrientes, no entanto dentro dos macrófagos e neutrófilos, *C. albicans* fagocitada passa da via da glicólise para a gluconeogênese (Fleck *et al.*, 2011). Em tecidos com baixa concentração de glicose, as vias metabólicas alternativas são necessárias para a obtenção de proteínas, aminoácidos, fosfolipídios e lipídios do hospedeiro (Ene *et al.*, 2012).

Células fagocíticas do sistema imune produzem espécies reativas do oxigênio e nitrogênio. Segundo trabalhos de Wysong *et al.* (1998) e Martchenko *et al.* (2004), *C. albicans* utiliza a catalase Cta1 e superóxido dismutase para a desintoxicação das espécies reativas de oxigênio (ROS), em modelos de candidose sistêmica em ratos. Segundo Mühlischlegel & Fonzi (1997), *C. albicans* possui  $\beta$ -glicosidases de parede celular que são importantes para a regulação nas mudanças de pH, como a Phr1 e a Phr2, sendo expressas em pH alcalina-neutro e pH ácido, respectivamente.

Slutsky *et al.* (1987), observaram a importância da mudança epigenética da morfologia de *C. albicans* na patogenicidade, podendo apresentar células brancas, que são redondas, e células opacas, que são elipsóides. As células brancas são mais virulentas em infecções sistêmicas que as células opacas (Kvaal *et al.*, 1996) e menos susceptíveis a fagocitose pelos macrófagos (Lohse e Johnson, 2008).

## **2.4 Resistência aos antifúngicos**

O aumento dos níveis de resistência dos microrganismos aos antimicrobianos disponíveis tem levado ao aumento de estudos que verificam os mecanismos moleculares de aquisição e transmissão de resistência entre os microrganismos, entre eles as formas como as bactérias recrutam e mobilizam os genes de resistência a antibióticos (González-Zorn e Escudero, 2012)

Diversos são os mecanismos de resistência aos antimicrobianos existentes e, entre eles, podemos citar: a inativação das drogas antimicrobianas, através de enzimas

que modificam a droga tornando-a inativa ou menos ativa em concentrações terapêuticas; e modificações no alvo do antibiótico, que resultam na diminuição da afinidade pelas estruturas moleculares gerando um mecanismo de resistência. Alguns alvos dos antibióticos são intracelulares, ou seja, precisam atingir o citoplasma. Dessa forma, um mecanismo de resistência das bactérias é a perda das porinas presentes na parede celular que limita a entrada dessas moléculas na célula bacteriana e também as bombas de extrusão exercidas por proteínas que promovem o efluxo das moléculas do antibiótico para o ambiente extracelular (González-Zorn e Escudero, 2012).

Bactérias e fungos desenvolveram mecanismos de resistência aos antimicrobianos comerciais. Estudos demonstram que nos últimos anos, as infecções na corrente sanguínea causadas por *Candida glabrata* resistente a múltiplos triazóis e equinocandinas tem aumentado (Pfaller *et al.*, 2012).

Os triazóis inibem a enzima 14- $\alpha$ -demetilase responsável pela conversão do lanosterol para o ergosterol, limitando a via da biossíntese do ergosterol, resultando em anormalidades na fluidez e função da membrana, impedindo o crescimento das células fúngicas. Entre os mecanismos de resistência de espécies de *Candida* spp. associados aos triazóis, estão as mutações no gene ERG11 que é o alvo das drogas, através da alteração do domínio de ligação de alguns triazóis, provocando a diminuição da sua potência (Perlin, 2009; Pfaller, 2012).

Outro fator associado a resistência aos triazóis é a superexpressão de genes envolvidos na via de biossíntese de esteróis e a auto-regulação dos genes CDR1 e CDR2 que codificam proteínas transportadoras do tipo ATP- binding-cassete que atuam como bombas de efluxo transmembranas e utilizam a hidrólise do ATP para mobilizar compostos hidrofóbicos para fora da célula, reduzindo o acúmulo de antifúngico no meio intracelular (MacCallum *et al.*, 2010).

## **2.5 Biofilme de *Candida*.**

As espécies de *Candida* são capazes de formar biofilmes em muitos dispositivos médicos implantados (Douglas, 2003). Uma vez que *Candida* spp. se



aderiu e evadiu da resposta imune do paciente (Seider *et al.*, 2010), pode colonizar órgãos e implantes internos como próteses e marcapassos (Borghi *et al.*, 2011).

Segundo El Azizi (2004), a arquitetura complexa dos biofilmes é intrinsecamente estratificada e espacialmente organizada em populações de espécies mistas, com um grau de interação entre elas. Segundo Hawser *et al.* (1998), o biofilme de *Candida albicans* consiste de uma densa cadeia de leveduras, hifas e pseudohifas, unidas em uma matriz a qual é sintetizada.

*Candida* spp. realiza o contato com os materiais inertes através da parede celular, que é composta de polissacarídeos, quitina, manoproteínas, e dois tipos de proteínas covalentemente ligadas, chamadas de GPI (glicosilfosfatidilinositol) e Pir proteínas (proteínas com repetições internas) (Chaffin *et al.*, 1998; Weig *et al.*, 2004).

A formação de um biofilme tanto bacteriano como fúngico, inclui cinco fases: aderência das células à superfície, formação inicial de colônias, secreção de substâncias poliméricas extracelulares, maturação e dispersão celular (Stoodley *et al.*, 2002, Monroe, 2007; Chandra *et al.*, 2008, Mowat *et al.*, 2009)

Segundo Chandra *et al.* (2001), o biofilme formado por espécies de *Candida* spp. pode ser caracterizado por três fases de desenvolvimento: a fase inicial, envolvendo a adesão das células fúngicas ao substrato; fase intermediária, na qual os blastóporos se coagregam e proliferam, formando uma comunidade a qual produz uma matriz extracelular de polissacarídeos; e a fase de maturação, o na qual as células fúngicas estão completamente envolvidas pela matriz extracelular de polissacarídeos.

Segundo Donlan & Consterton (2002), as células que formam biofilme são fenotipicamente distintas das células planctônicas, sendo menos susceptíveis aos agentes antimicrobianos. A matriz formada no biofilme é tridimensional, originando um ambiente altamente hidratado e carregado, no qual os microrganismos ficam imobilizados (Fleming *et al.*, 2000). As microcolônias ficam envoltas pela matriz, separadas por canais de água, onde ocorre a circulação de nutrientes para o biofilme (Donlan e Consterton, 2002).

Os componentes da matriz variam de acordo com os microrganismos presentes, e formam uma barreira na entrada das drogas antimicrobianas, impedindo o acesso às células que estão mais internas no biofilme (Drenkard, 2003). Estudos demonstram que as espécies *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*

isoladas de infecções fúngicas causam entre 25 a 50% de mortalidade, quando comparados com cepas isolados de espécies incapazes de formar biofilme (Kunamoto, 2002). Quando uma comunidade de microrganismos ataca uma superfície de um organismo, passa a expressar características fenotípicas distintas (Dohlan e Costerton, 2002). No biofilme, os microrganismos conseguem evadir da resposta imune do hospedeiro (Wilson, 2001).

Durante a formação do biofilme de *C. albicans*, as células se comunicam por *quorum sensing*, que modula o desenvolvimento, o crescimento e a dispersão celular (Hogan, 2006). Segundo Hogan (2006) e Hornby *et al.* (2001), duas moléculas sinalizadoras são caracterizadas no biofilme, tirosol e farnesol. O tirosol promove a formação de hifa no estágio inicial de formação do biofilme, enquanto o farnesol inibe a formação de hifa, prevenindo o crescimento excessivo do biofilme.

A matriz extracelular do biofilme de *C. albicans* é composta de  $\beta$  1,3 glucanos que sequestram azóis e polienos dos antifúngicos, prevenindo o acesso dos antifúngicos às células do biofilme (Nett *et al.*, 2007), além de proteger *Candida spp.* das células fagocíticas e promover a manutenção de nutrientes (Cuéllar-Cruz *et al.*, 2012). Estudos demonstram que o nicho dentro do biofilme de *C. albicans* é um ambiente hipóxico, sendo esta adaptação uma característica importante para a formação do biofilme (Rossignol *et al.*, 2009).

O material presente no meio e os nutrientes favorecem a formação do biofilme; resíduos de galactose e alguns íons metálicos favorecem a adesão de *C. albicans* às células e a materiais plásticos, sendo que a concentração e a presença desses íons podem afetar a estrutura do biofilme (El-Azizi e Khardori, 1999; Cuéllar-Cruz *et al.*, 2012).

Autores relatam que materiais de superfície acrílica, elastômeros de silicone, poliestireno, cloreto de nylon e polivinil propiciam um melhor ambiente para a formação de biofilme por *C. albicans* (El-Azizi e Khardore, 1999; Hawser & Douglas, 1994; McCourtie e Douglas, 1991).

A morfologia de hifa é necessária para a formação de um biofilme, assim como a interação célula-substrato, célula-célula e a produção de matriz extracelular, os quais são passos importantes na formação do biofilme (Blankenship, 2006; d'Enfert, 2006).

Na odontologia, biofilmes ocasionam diversos problemas, segundo Budtz e Jorgensen (1990), na superfície de próteses de acrílico, ocorre a formação de um biofilme misto de espécies, com grande número de bactérias, particularmente estreptococos e leveduras, sendo esta uma forma de resistência dos microrganismos. Além disso, estudos demonstraram que o desenvolvimento de resistência aos antifúngicos como o fluconazol em cepas de *Candida* isoladas de pacientes aidéticos (Ruhnke *et al.*, 1994) ocorre durante o tratamento (Johnson *et al.*, 1995; Redding *et al.*, 1994), onde são administradas altas doses, com o uso prolongado desse antifúngico (Pfaller *et al.*, 1999; Ruhnke *et al.*, 2000). Provavelmente, a redução da sensibilidade da *C. albicans* e outras espécies aos antifúngicos azóis se deve ao fato de que todos eles tem o mesmo mecanismo de ação (Vanden-Bosche *et al.*, 1994; Dronda *et al.*, 1994).

## **2.6 *Staphylococcus aureus***

Doenças sistêmicas muitas vezes são causadas por bactérias transientes, que podem ser provocadas através da mastigação, da escovação dos dentes, uso de fio dental ou de procedimentos cirúrgicos. Este risco de infecção é maior em pacientes com doença periodontal por causa do aumento do risco de bacteremia devido à proximidade destes organismos com a corrente sanguínea (Slots, 2003).

Da mesma forma que *Staphylococcus aureus* pode ser considerado um organismo transiente da cavidade oral, sua frequente presença neste local pode ser considerada uma potencial fonte de infecção (Smith e MacFarlane, 1999).

*Staphylococcus aureus* é um dos mais significantes agentes etiológicos de processos infecciosos adquiridos, tanto em pacientes ambulatoriais como em pacientes hospitalizados, apresentando vários fatores como toxinas e enzimas que contribuem para sua virulência (Catão *et al.*, 2006). Está envolvida em infecções na corrente sanguínea, no trato respiratório, na pele e nos tecidos moles (DeLeo e Chambers, 2009).

Souto *et al.* (2006) relatam alta prevalência e níveis de *S. aureus* em sítios de periodontite crônica, correlacionando a presença de bactérias não-orais com a periodontite crônica.

Estudos demonstraram que algumas infecções na cavidade bucal são causadas, em parte, por esse microrganismo, como infecções endodônticas, osteomielites da mandíbula, infecção da glândula parótida e, mais recentemente, uma forma de mucosite bucal em idosos, principalmente em pacientes recebendo nutrição parenteral (Smith *et al.*, 2001).

Nos últimos anos tem sido observado um aumento da resistência aos agentes antimicrobianos e antifúngicos. Emergentes cepas com resistência intermediária ou alta à penicilina estão crescendo e sendo reconhecidas mundialmente (Teng *et al.*, 1998). Porém essa resistência não é somente aos  $\beta$ -lactâmicos, mas também a muitos outros agentes antimicrobianos, como a vancomicina (Fridkin *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2004; Tsuda *et al.*, 2002).

Cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) expressam vários fatores de virulência, entre elas, proteínas de superfície que auxiliam na adesão aos tecidos e evasão do sistema imune do hospedeiro (Foster e Höök, 1998), toxinas e superantígenos que causam dano epitelial (Bonach e Foster, 2000). Cepas de MRSA são frequentemente isolados em hospitais, sendo que a propagação pode ser considerada clinicamente significativa. Krebs *et al.* (2011), verificaram que 2% dos pacientes foram colonizados por MRSA durante a internação. O aumento da transmissão entre pacientes internados ocorre devido à prescrição de antibióticos como fluoroquinolonas e  $\beta$ -lactâmicos que selecionam MRSA resistentes (Knight *et al.* 2012).

## ***2.7 Streptococcus mutans***

A cavidade bucal é um ambiente que apresenta muitas flutuações, como na oferta de nutrientes, na temperatura, pH e no fluxo de saliva, selecionando os microrganismos que conseguem se adaptar a essas mudanças através da formação de biofilme .

*Streptococcus mutans* é considerado o agente etiológico primário no início da cárie dental humana (Tanzer *et al.*, 2001). Os diferentes sítios anatômicos da cavidade bucal apresentam microambientes distintos (Aas *et al.*, 2005). A prevalência

de *S. mutans* não se encontra apenas em pessoas com moderada ou alta taxa de cárie, mas também nas populações com ausência ou baixa incidência da mesma (Napimoga *et al.*, 2004). *Streptococcus mutans* produz ácidos que provocam a dissolução da estrutura na presença de carboidratos fermentáveis como a sacarose, a frutose e a glicose (Kleinberg, 2002).

Os estreptococos são divididos em seis grupos: grupo mutans, que compreende as espécies *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. downei*; grupo salivarius, que compreende a espécie *Streptococcus salivarius* e *S. vestibulares*; grupo anginosus, que compreende *S. anginosus*, *S. intermedius* e *S. constellatus*; grupo mitis, que compreende *S. mitis*, *S. oralis*, *S. cristatus*, *S. sanguinis*, *S. parasanguinis*, *S. infantis*, *S. gordonii* e *S. pneumoniae*; grupo bovis, que compreende *S. infantarius* e *S. gallontycus* e grupo piogênico que inclui *S. pyogenes*, *S. uberis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactae* (Nobbs *et al.*, 2009).

*Streptococcus mutans* produz as glicosiltransferases que permitem que a sacarose seja quebrada em monômeros de glicose, sendo este açúcar importante na formação da cárie (Ogawa *et al.*, 2011).

Bactérias gram-positivas anaeróbias facultativas comumente se aderem à película adquirida, entre elas a espécie *S. mutans* (Kolenbrander *et al.*, 2002). A película adquirida é um filme que se forma logo após a exposição ao substrato no ambiente bucal, através da adsorção de proteínas e peptídeos da saliva (Pereira-Cenci *et al.*, 2008) e provém a adesão inicial de colonizadores primários através de receptores (Davey e Consterton, 2006).

Outras doenças, além da cárie estão relacionadas com *S. mutans*. A endocardite é uma doença associada ao biofilme em válvulas cardíacas, induzido por estreptococos e estafilococos bucais (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). A persistência do biofilme induz a inflamação e pode contribuir para a bacteremia crônica e eventos trombóticos. Nomura *et al.* (2004) e Teng *et al.* (1998), relatam a presença de *S. mutans* em pacientes com endocardite infecciosa e com sérias infecções piogênicas.

A formação de biofilme leva a persistência da infecção e resistência às terapias antimicrobianas convencionais (Anderson e O'Toole, 2008). Estima-se que 65% das infecções são resultantes de biofilmes resistentes aos medicamentos (Silva, 2009). Torna-se necessário o desenvolvimento de novos antimicrobianos para o

tratamento dessas doenças infecciosas, visto que vários estudos relatam os problemas na saúde desencadeados por esses mecanismos de resistência desenvolvidos pelos microrganismos aos antimicrobianos disponíveis no mercado.

### 3. PROPOSIÇÃO

Com base nos dados obtidos na literatura, os objetivos deste trabalho foram:

- Extrair e isolar os constituintes químicos presentes no óleo da semente de *Pterodon pubescens* através do fracionamento cromatográfico.
- Testar as frações isoladas para analisar a atividade antimicrobiana em quatro espécies de *Candida*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans* através da Concentração Inibitória Mínima (CIM).
- Verificar através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) as modificações celulares provocadas nas cepas que foram inibidas pelo diterpeno com esqueleto vouacapano isolado da semente de *Pterodon pubescens*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material vegetal

Foi utilizado o óleo da semente de *Pterodon pubescens* (sucupira) (Figura 1), proveniente de São Carlos, identificada pelo Prof. Jorge Yoshio Tamashiro, (exsicatas 1398 e 1402), depositada no Herbarium do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (IB/Unicamp).



Figura 1- Sementes de *Pterodon pubescens*

#### 4.1.1 Obtenção do óleo

O óleo da semente *P. pubescens* foi obtido através da extração de 210,11 g de sementes, moídas com gelo seco em um liquidificador industrial, para posteriormente extrair o óleo através de um Extrator de Soxhlet com o solvente diclorometano.

Foi obtido 101,16 gramas de extrato bruto, que foi posteriormente submetido a uma coluna filtrante (Figura 2).



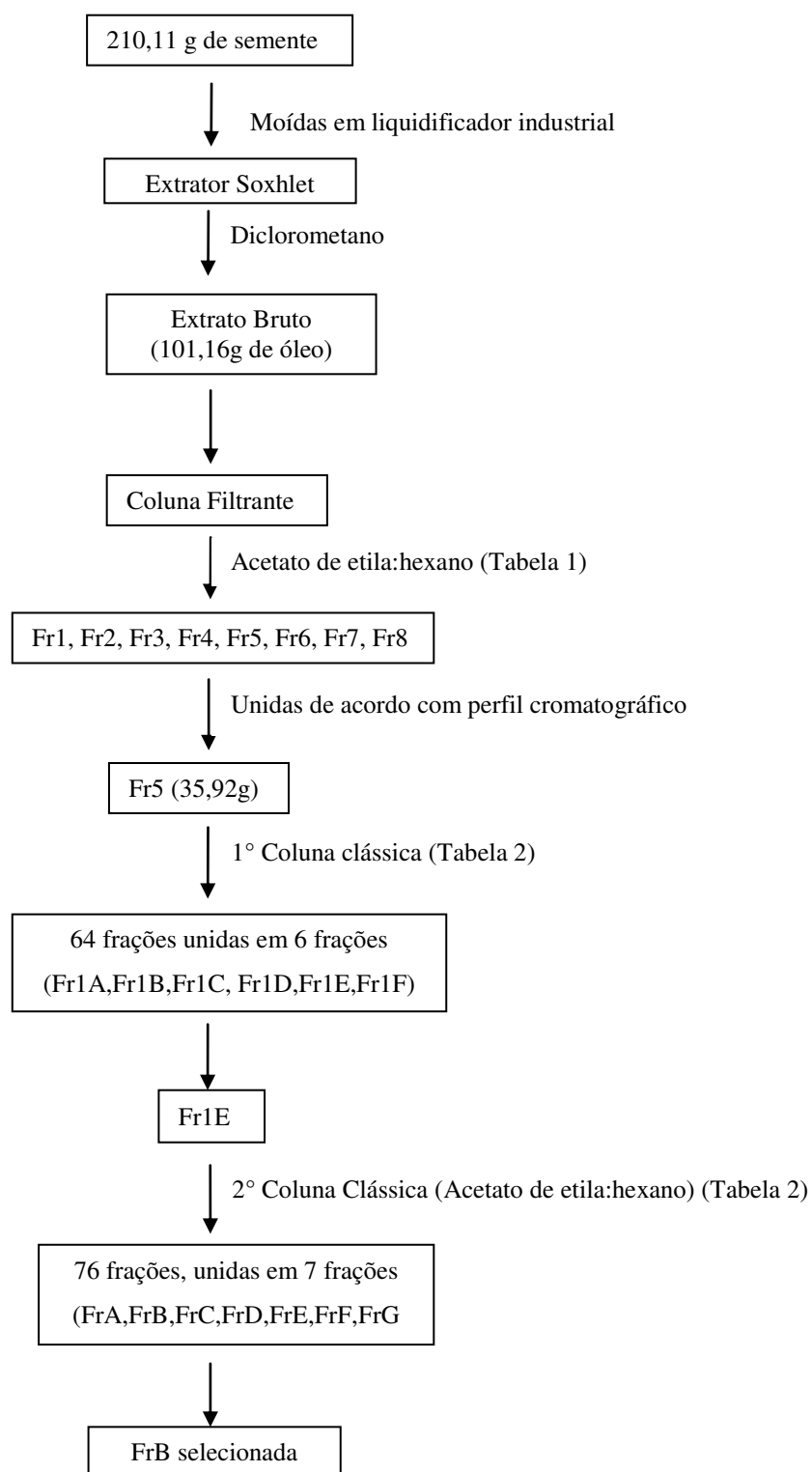


Figura 2 - Extração do óleo realizada com aparelho de Soxhlet e fracionamento em coluna realizado com os solventes acetato de etila e hexano.

## 4.2 Métodos Cromatográficos

### 4.2.1 Coluna Filtrante

A cromatografia em coluna filtrante (Figura 3) foi feita colocando-se o extrato bruto em suporte de vidro com placa porosa, empregando-se como fase estacionária com Silicagel 60® (Merck, 0,063-0,200 mm) na proporção de 1:3 (amostra: sílicagel), coletando-se as frações em frascos de 15 mL. Foi utilizado acetato de etila e hexano, com variação de gradiente quando necessário (Tabela 1), para promover a separação do composto. As frações obtidas foram concentradas utilizando-se vácuo em rotaevaporador Buchi RE 120.

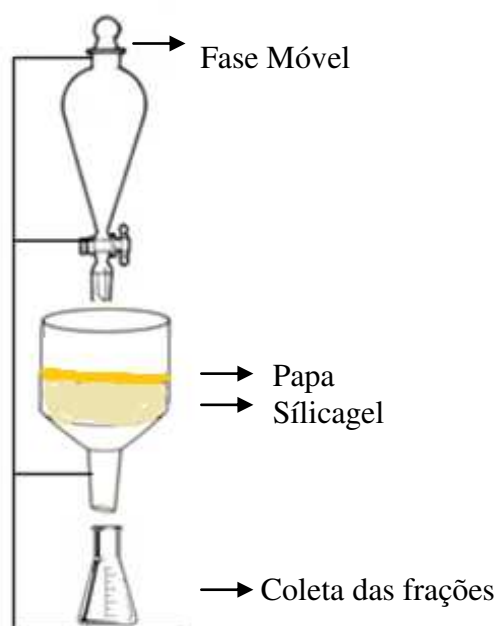


Figura 3 - Coluna filtrante realizada com o extrato bruto.

Tabela 1: Cromatografia em Coluna Filtrante.

Hexano (mL)	Acetato de Etila (mL)
500	0
400	100
300	200
275	225
250	250
225	275
200	300
175	325
150	350
125	375
100	400
25	475
0	500

#### 4.2.2 Cromatografia em Coluna Clássica

As cromatografias em coluna clássica (Figura 4) foram efetuadas em suporte de vidro recheado com Silicagel 60® (Merck, 0,063-0,200 mm). Foi utilizada a proporção de cada grama de amostra multiplicada por 5 de sílica para a montagem da coluna (amostra: silicagel). Para a eluição foram utilizados hexano e acetato de etila como solventes em gradiente de polaridade (Tabela 2). A quantidade de solvente utilizada foi referente ao volume da sílica utilizada na coluna.

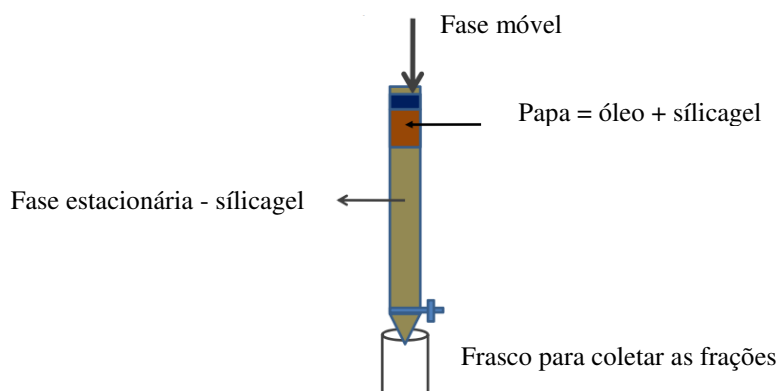


Figura 4 - Cromatografia em coluna clássica realizada com as frações FR5 e FR1E.

Tabela 2: Gradientes de concentração da primeira e segunda cromatografia em coluna clássica

<b>Hexano (mL)</b>	<b>Acetato de Etila (mL)</b>
400	0
360	40
320	80
280	120
260	140
240	160
220	180
200	200
180	220
160	240
140	260
120	280
100	300
80	320
60	340
40	360
20	380
0	400

#### 4.2.3 Análise por Cromatografia em Camada Delgada

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram feitas em cromatofolhas prontas (Merck® artigo 5554) e a detecção das frações foi feita sob lâmpada ultravioleta a 254nm, com posterior pulverização com solução ácido acético: ácido sulfúrico: anisaldeído (50: 1: 0,5), seguido de aquecimento em estufa a 100°C durante 50 segundos. Observou-se os seguintes frações: FrB, C29, 404 e F2.

#### 4.2.4 Análise Quantitativa por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas

As frações e substâncias puras foram diluídas em acetato de etila ou metanol e analisadas por cromatografia gasosa capilar acoplada a um detector de massas (CG Hewlett Packard 6890, série II, diretamente acoplado a um detector seletivo de massa Hewlett Packard 5970, equipado com uma coluna de sílica fundida WCOT, 30m x 0,25mm, DB-1 ou DB-5, ou similares). As condições de análise foram: temperatura de injeção: 250°C; temperatura do detector: 300°C; programa de temperatura: 40(2min)-240°C, 5°C/min, 240-300°C, 10°C/min; com ou sem razão de split 1:100 (dependendo da concentração da amostra); gás de arraste He 0,7 bar, 1mL/min.

#### 4.3 Cepas de Microrganismos

As cepas bacterianas (Tabela 3) fazem parte da coleção de bactérias do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba. As cepas de leveduras (Tabela 4) fazem parte da coleção Holandesa CBS e do Banco da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, pertencentes ao Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Para a formação do biofilme a cepa usada foi proveniente da Micoteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da FOP/UNICAMP.

Tabela 3: Cepas de bactérias utilizadas no experimento CIM.

<b>Espécie</b>	<b>Cepa</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Streptococcus mutans</i>	UA 159

Tabela 4: Cepas de leveduras utilizadas nos experimentos de CIM e biofilme.

<b>Espécie</b>	<b>Cepa</b>
<i>C. albicans</i>	CBS 562
<i>C. tropicalis</i>	CBS 94
<i>C. glabrata</i>	IZ 07
<i>C. krusei</i>	CBS 573
* <i>C. albicans</i>	SC 5314

\*Cepa utilizada para formação do biofilme

#### *4.4 Concentração Inibitória Mínima (CIM) – Método de Microdiluição.*

##### *4.4.1 Levedura*

O preparo dos inóculos para os testes de suscetibilidade seguiu as recomendações do protocolo M27-A2 (CLSI, 2002). Culturas de 24 horas de leveduras foram preparadas em NaCl 0,9% (5mL), comparando-se a turbidez com a escala de Mc Farland (0,5) e ajustando sua absorvância entre 0,08 a 0,10A, a 530nm, com uma densidade equivalente a  $5,0 \times 10^6$  céls/mL. Em seguida, foi feita a diluição seriada, até alcançar uma concentração de  $5,0 \times 10^3$  céls/mL em caldo de cultura RPMI-1640. A 100µL do composto e/ou antimicrobiano diluído foi adicionado 100µL de meio de cultura, em uma diluição seriada, e adicionado de 100µL do microrganismo em placa de 96 poços. Foi feito o monitoramento dos inóculos, meio de cultura, antimicrobianos e diluentes utilizados. Foi feito o controle do NaCl, meio de cultura (RPMI-1640) e da nistatina. Os compostos foram sequencialmente diluídos para uma concentração de 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,12 mg/mL, 0,0625 mg/mL, 0,0312 mg/mL e 0,0156 mg/mL.

##### *4.4.2 Bactérias*

O preparo dos inóculos para os testes de suscetibilidade seguiu as recomendações do protocolo M7-A6 (CLSI, 2003). As culturas de 24 horas foram preparadas em NaCl 0,9% esterilizada (5mL), comparando-se a turbidez com a escala Mc Farland (0,5) e ajustando a absorvância entre 0,08 e 0,10 a 625 nm para se obter uma densidade de  $1,5 \times 10^8$  cel/mL. A partir disso, fez-se uma diluição seriada para alcançar uma densidade de  $1,5 \times 10^6$  cel/mL em meio BHI. O procedimento seguinte foi feito como citado no item 4.4.1, usando o cloranfenicol como controle.

#### *4.5 Diluição dos compostos diterpeno com esqueleto vouacapano (FrB), geranilgeranio (C29), 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -diidroxivouacapano-17 $\beta$ oato de metila (F2) e isômeros éster 6 $\alpha$ -hidroxi-*

*7β-acetoxi-vouacapano-17β-oato de metila e 6 α-acetoxi-7β- hidroxi-vouacapano-17β-oato de metila (404).*

Os compostos foram diluídos a uma concentração de 5mg/mL, com DMSO 1% (dimetil sulfóxido), adicionado água destilada e estocado em freezer, para posteriormente realizar uma diluição na concentração de 2 mg/mL para os testes de susceptibilidade.

#### *4.5.1 Diluição da nistatina e cloranfenicol.*

Uma alíquota de 50 mg do antifúngico nistatina e cloranfenicol foram diluídos em 10 mL de água destilada para obter uma solução estoque de 5mg/mL. A partir da solução-mãe, foi feita uma solução para uso nos testes de susceptibilidade na concentração de 2mg/mL e estocada em freezer.

#### *4.6 Leitura dos resultados da CIM*

As placas, tanto de levedura como de bactérias, foram incubadas em estufa de aerobiose para *Candida spp.* e *S. aureus*, e estufa de CO<sub>2</sub> para *S. mutans* a 37°C por 24-48h, em triplicata, para determinar se a atividade do composto vegetal é microbicida ou microbiostática, com base na sua concentração fungicida/fungistática e bactericida/bacteriostática mínima (CFM/CBM), respectivamente. A leitura foi feita visualmente com base no depósito do microrganismo no fundo do poço.

#### *4.7 Teste de biofilme em formação*

A cultura de *C. albicans* SC5314 foi preparada 24h antes do experimento em frasco contendo YPD e incubada sob agitação a 180 rpm a 30°C. Posteriormente, a cultura foi centrifugada e ao precipitado foi adicionado meio RPMI-1640 para o preparo da suspensão celular. As células foram contadas em hemocítmetro e calculado o

volume necessário para uma suspensão com  $1 \times 10^6$  céls/mL. Para a produção do biofilme, 100 $\mu$ L desse inóculo foram adicionados às placas de 96 poços (Figura 5), com as frações adicionadas e posteriormente incubadas por 24h a 37°C, de acordo com Pierce *et al.* (2008).

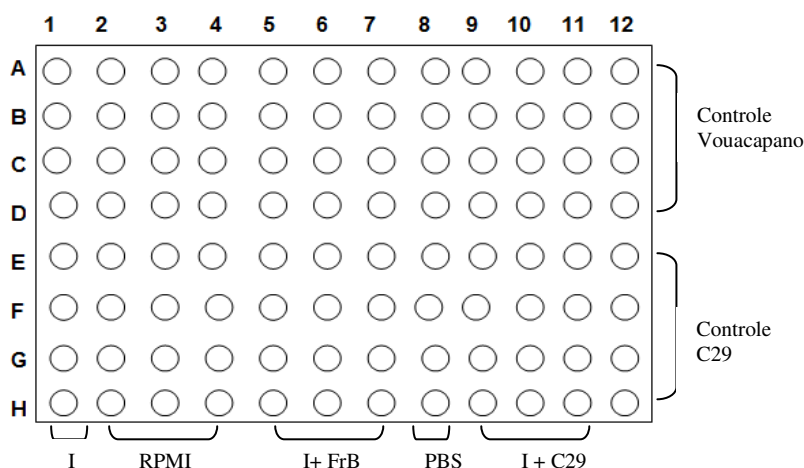


Figura 5 - Distribuição das amostras nas colunas da placa de 96 poços para formação do biofilme (I: inóculo, FrB: fração B = diterpeno com esqueleto vouacapano).

#### 4.7.1 Quantificação do biofilme

Para a quantificação do biofilme (absorbância), o mesmo foi lavado 2X com PBS e acrescentado de solução corante XTT (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil)-2H-tetrazolium-5-carboxanilida) sendo incubado em estufa durante 2 horas. Em seguida, foi feita a leitura em um espectrofotômetro com leitor de microplacas a 490 nm. Foram subtraídos os valores de absorbância do biofilme controle para avaliar a quantidade de biofilme formado.

#### 4.8 Preparo das amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura e de Transmissão

##### 4.8.1 Preparo das amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura



As amostras foram preparadas na placa de 96 poços conforme o item 4.4.2. Após 24 horas de crescimento em estufa, as mesmas foram centrifugadas para a formação de *pellets*, o qual foi lavado duas vezes com tampão fosfato (pH 7,4) sendo posteriormente adicionado glutaraldeído a 2% (v/v), por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram desidratadas com banhos sequenciais de etanol, nas concentrações de 50%, 70%, 90% e etanol absoluto (2X). Na sequência, foi feita a metalização com ouro, durante 120 segundos, em um metalizador BAL-TEC SCD 050 (Balzers Liechtensteins). A análise das amostras foi feita em um Microscópio Eletrônico de Varredura JSM-5600 Lv da JEOL (Tóquio, Japão), operando com aceleração de 15KV. Ao controle foram adicionadas apenas as amostras de leveduras.

#### *4.8.2 Preparo das amostras para Microscopia Eletrônica de Transmissão*

As amostras foram preparadas através da CIM, sendo feito o controle e as frações na concentração 1mg/mL. Após 24 horas de crescimento, as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 10.000 rpm para a formação dos pellets e lavadas 5x com tampão fosfato. Posteriormente foi feita a fixação, adicionando glutaraldeído a 2,5% com tampão fosfato 0,1M pH 7,2 e deixado 4 horas na geladeira (4-6°C), sendo lavado com tampão fosfato 0,1M pH 7,2 e fixado em tetróxido de ósmio em tampão fosfato 0,1M pH 7,2 por 2 horas em temperatura ambiente. Foi feita a lavagem com tampão fosfato 0,1M pH 7,2; foram feitas as desidratações em concentrações crescentes de acetona PA (Merck) 50%, 70%, 90% e infiltrado em resina Dr. Spurr nas seguintes concentrações: 3 : 1 – acetona-resina (4 horas); 2 : 1 – acetona-resina; 1 : 1 - overnight; 3 : 1 (4 horas); 9 : 1 (2 horas); resina pura (16 horas); resina pura (2:30 horas) e inclusão em resina por 48 horas - estufa 60-70°C.

Os blocos foram polimerizados e após foram feitos cortes semi-finos com 1µm de espessura utilizando um ultramicrotomo MT2B (Sorvall Porter Blum) com navalhas de vidro. Os cortes foram corados com azul de toluidina 1% em borato de sódio e observados em microscópio de luz, com a finalidade de selecionarmos a área a ser estudada. Em seguida, os blocos foram triados e cortes de 70-90nm de espessura foram obtidos em um ultramicrotomo MT2C (RMC) equipado com navalha de diamante. Os cortes foram coletados em grades de cobre (200 mesh) e contrastados com

acetato de uranila e citrato de chumbo. As grades contendo os cortes foram analisadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL JEM-1400 (Zeiss), operando com aceleração de 60Kv, do Centro de Microscopia e Imagens da Faculdade de Odontologia de Piracicaba- Unicamp (Responsável: Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Cromatografia em Camada Delgada

Através da Cromatografia em Camada Delgada verificou-se que a fração FrB isolada tinha características apolares como mostrado na Figura 6 abaixo.

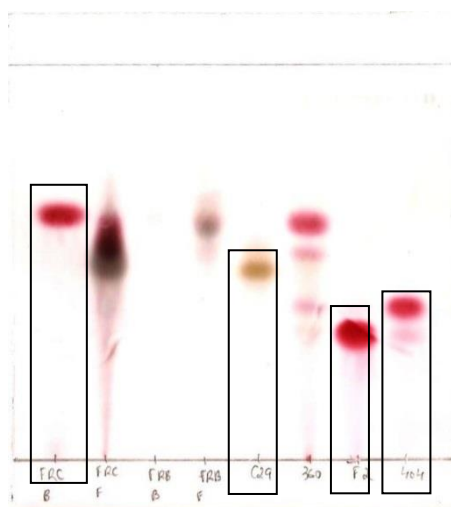


Figura 6 - CCD das frações FrB, C29, F2 e 404, respectivamente.  
Fase móvel acetato de etila/hexano 60:40.

#### 5.1.1 Análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas.

A Figura 7 representa o cromatograma obtido da fração FrB, identificado como um composto com um esqueleto vouacapano, com relação  $m/z$  207 e na Figura 8, o cromatograma das amostras doadas pelo laboratório de Fitoquímica do CPQBA/Unicamp.

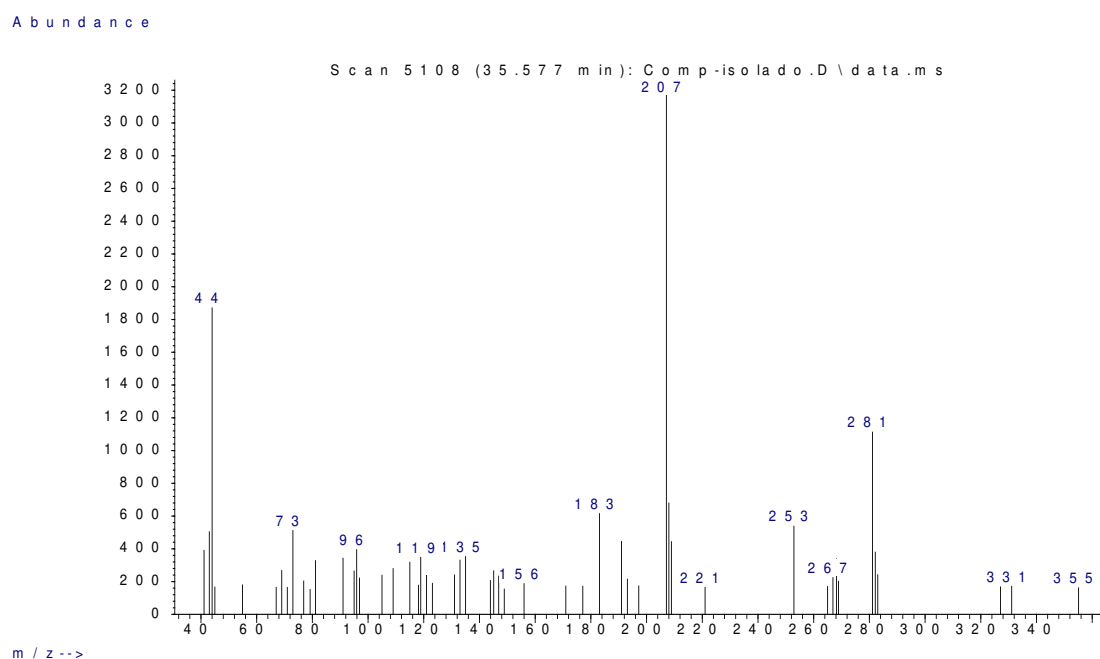


Figura 7 – Perfil cromatográfico observado por cromatografia gasosa por detector de massas (HP 6890/5975)  $m/z$  207, utilizando programação de temperatura de 110°C (5 min); 5°C/min; 240°C (5 min); temp. detector = temp. injetor = 250°C do diterpeno com esqueleto vouacapano, isolado do óleo da semente de *Pterodon pubescens* Benth.

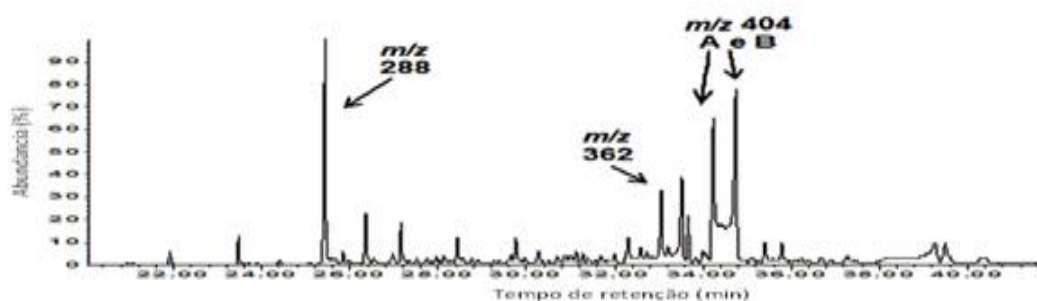


Figura 8 - Perfil cromatográfico observado por cromatografia gasosa por detector de massas (HP 6890/5975) utilizando programação de temperatura de 110°C (5 min); 5°C/min; 240°C (5 min); temp. detector = temp. injetor = 250°C das amostras doadas pelo CPQBA, o pico  $m/z$  288 geraniogeraniol; o pico  $m/z$  362 éster 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihidroxivouacapano-17 $\beta$  oato de metila e o pico  $m/z$  404 A/B corresponde aos isômeros éster 6 $\alpha$ -hidroxi-7 $\beta$ -acetoxi-vouacapano-17 $\beta$ -oato de metila; e acetoxi-7 $\beta$ -hidroxi-vouacapano-17 $\beta$ -oato de metila.

## 5.2 Fórmula molecular dos compostos

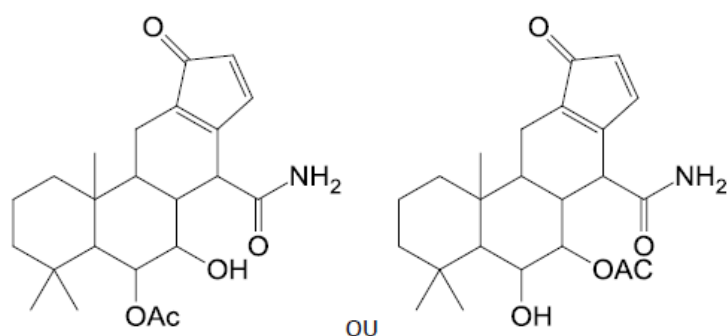


Figura 9 – Sugestão da estrutura química do diterpene com esqueleto vouacapano isolado, que deverá ser confirmada por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13.

Os compostos testados abaixo foram doados pelo Laboratório de Fitoquímica do CPQBA. (Figuras 10, 11 e 12).

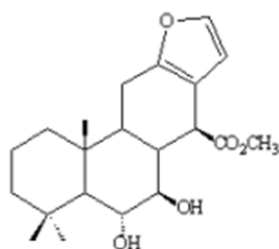


Figura 10 - Estrutura química do composto corresponde ao éster 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -diidroxivouacapano-17 $\beta$  oato de metila.

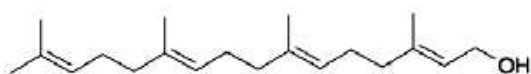


Figura 11 - Estrutura química do composto geranylgeraniol.

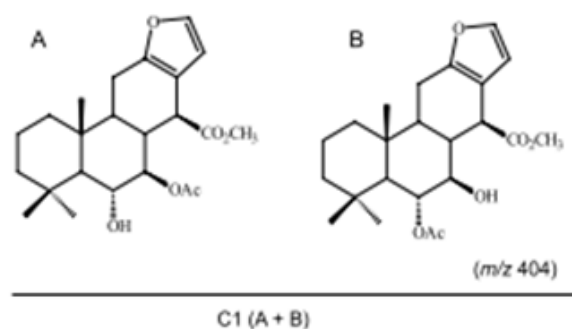


Figura 12 - Estrutura química dos isômeros éster 6 $\alpha$ -hidroxi-7 $\beta$ -acetoxi-vouacapano-17 $\beta$ -oato de metila e acetoxi-7 $\beta$ - hidroxi-vouacapano-17 $\beta$ -oato de metila.

### 5.3 Concentração Inibitória Mínima

O composto isolado diterpeno com esqueleto vouacapano, foi utilizado nos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) nas leveduras e bactérias. Nas Tabelas abaixo, pode-se observar os valores de CIM encontrados para as frações testadas para leitura em 24 horas (Tabela 5) e 48 horas (Tabela 6) para as cepas *Candida* spp., *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*.

Tabela 5: Resultado da leitura (mg/mL) visual do efeito das frações FrB (diterpeno com esqueleto vouacapano), C29 (geranilgeraniol), 404 (éster 6 $\alpha$ -hidroxi-7 $\beta$ -acetoxi-vouacapano-17 $\beta$ -oato de metila e acetoxi-7 $\beta$ - hidroxi-vouacapano-17 $\beta$ -oato de metila) e F2 (éster 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -diidroxivouacapano-17 $\beta$  oato de metila) em mg/mL, após 24 horas (formação de depósito de microrganismos no fundo do poço) nas cepas de *Candida* spp. e bactérias *S. aureus*, *S. mutans*.

Microorganismo	FrB	C29	404	F2	Nistatina	Cloranfenicol
<i>C. albicans</i>	2	*	*	*	0,5	-
<i>C. krusei</i>	2	*	*	*	0,5	-
<i>C. glabrata</i>	2	*	*	2	0,5	-
<i>C. tropicalis</i>	2	*	*	*	0,5	-
<i>S. aureus</i>	2	*	*	*	-	0,25
<i>S. mutans</i>	2	*	*	*	-	0,25

\*Valores acima de 2 mg/mL.

Tabela 6: Resultado da leitura visual do efeito das frações FrB, C29, 404 e F2 (mg/mL), isoladas de *P. pubescens*, após 48 horas (formação de depósito de microrganismos no fundo do poço) nas cepas de *Candida* spp. e bactérias *S. aureus*, *S. mutans*.

Microrganismo	FrB	C29	404	F2	Nistatina	Cloranfenicol
<i>C. albicans</i>	2	*	*	*	0,5	-
<i>C. krusei</i>	2	*	*	*	0,5	-
<i>C. glabrata</i>	2	*	*	*	0,5	-
<i>C. tropicalis</i>	2	*	*	*	0,5	-
<i>S. aureus</i>	2	*	*	*	-	0,25
<i>S. mutans</i>	2	*	*	*	-	0,25

\*Valores acima de 2 mg/mL.

Nos poços referentes aos controles negativo (RPMI-1640, salina, extrato) fez-se a leitura para confirmar que não houve contaminação. Os que apresentaram resultado positivo, ou seja, que não houve crescimento, foram plaqueados em Ágar Sabouraud Dextrose para confirmar a atividade fungicida da fração FrB, observando-se que após 24 e 48 horas que não houve crescimento (Figura 13).

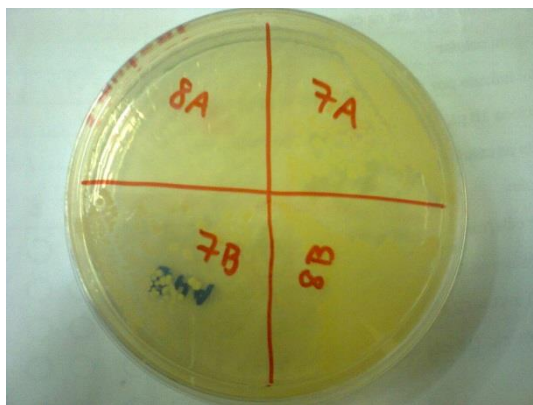


Figura 13 – Repique dos poços 7A, 7B, 8A, 8B que não tiveram crescimento após 48 horas foram semeados na placa de Ágar Sabouraud Dextrose.

#### 5.4 Ação dos compostos isolados do óleo da semente de *Pterodon pubescens* sobre o biofilme de *Candida albicans* SC 5314.

Após 24 horas, foi feita a leitura do biofilme de *C. albicans* (SC 5314) e verificou-se a atividade dos compostos diterpeno com esqueleto vouacapano (Figura

14), geranilgeraniol (C29) (Figura 15), dos isômeros éster  $6\alpha$ -hidroxi- $7\beta$ -acetoxi-vouacapano- $17\beta$ -oato de metila e acetoxi- $7\beta$ -hidroxi-vouacapano- $17\beta$ -oato de metila (404) (Figura 16) e do  $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapano- $17\beta$  oato de metila (362) (Figura 17). Comparado com o biofilme controle, foi observado que a 1mg/mL o vouacapano (Figura 13) e o geranilgeraniol (Figura 14) inibiram 70% do biofilme, já os isômeros éster  $6\alpha$ -hidroxi- $7\beta$ -acetoxi-vouacapano- $17\beta$ -oato de metila e acetoxi- $7\beta$ -hidroxi-vouacapano- $17\beta$ -oato de metila (404) não demonstraram atividade sobre o biofilme, pois na concentração máxima testada, 4 mg/mL houve inibição de apenas 39% do biofilme (Figura 15). O composto  $6\alpha,7\beta$ -diidroxivouacapano- $17\beta$  oato de metila (F2) não apresentou atividade sobre o biofilme, pois a 4mg/mL inibiu apenas 40% do biofilme (Figura 16).

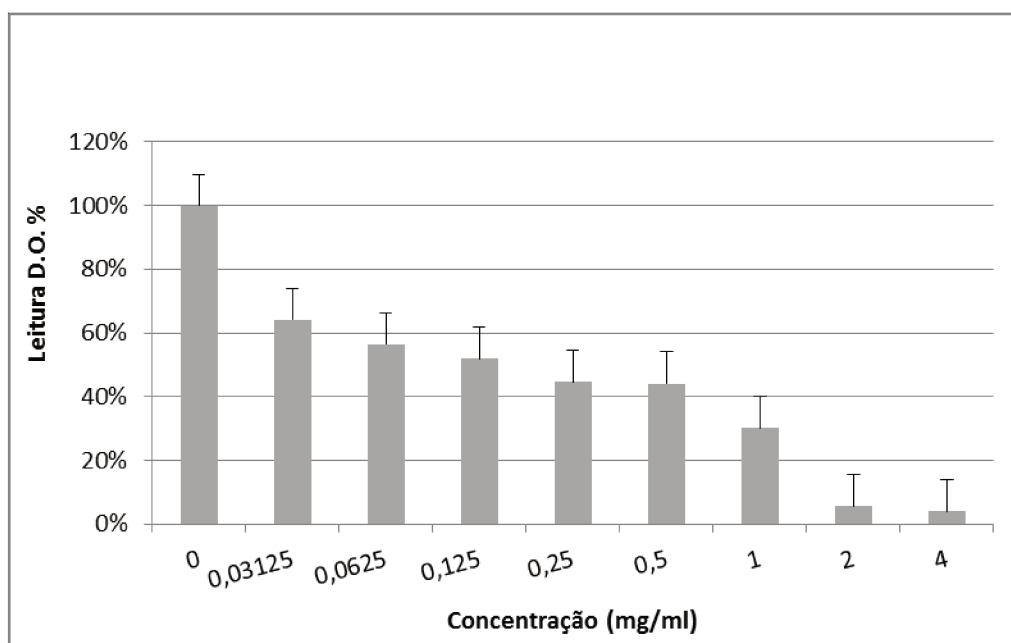


Figura 14 - Efeito do diterpeno com esqueleto vouacapano no biofilme de *Candida albicans* SC 5314.



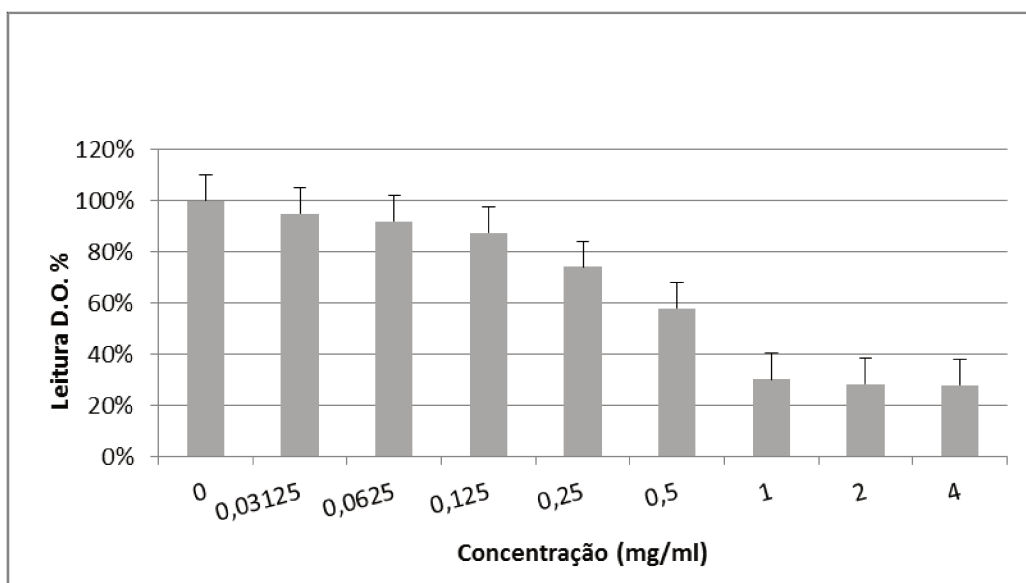


Figura 15 – Efeito do geraniol no biofilme de *Candida albicans* SC 5314.

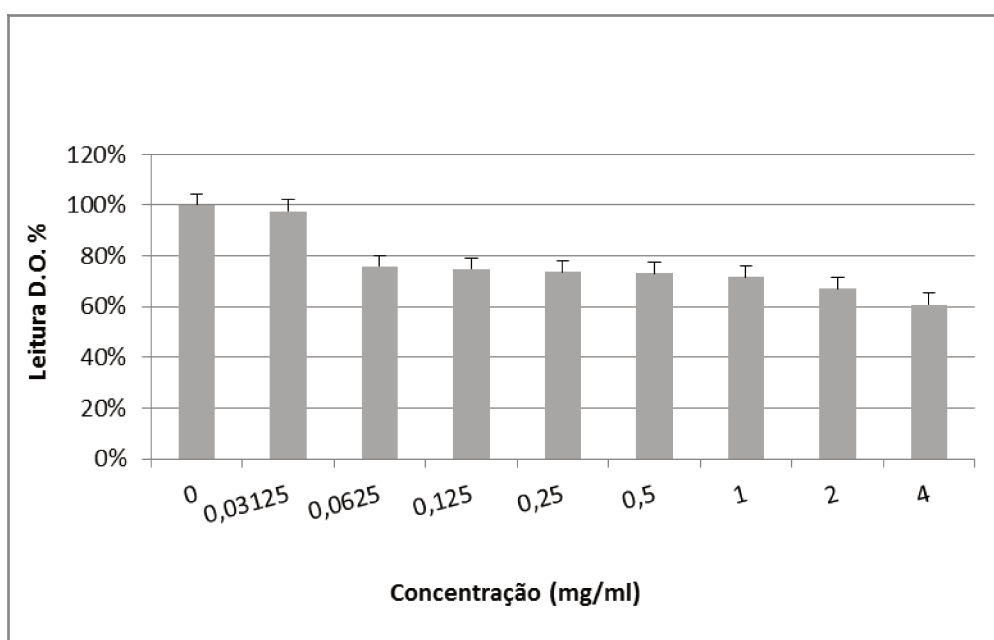


Figura 16 - Efeito dos isômeros éster 6 $\alpha$ -hidroxi-7 $\beta$ -acetoxi-vouacapano-17 $\beta$ -oato de metila e acetoxi-7 $\beta$ - hidroxi-vouacapano-17 $\beta$ -oato de metila (404) no biofilme de *Candida albicans* SC 5314.

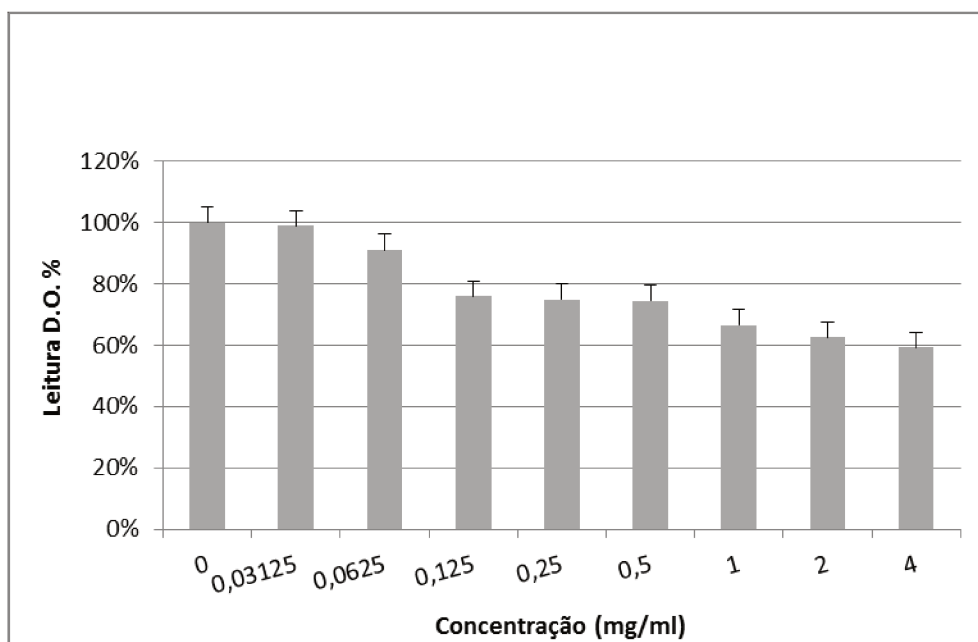


Figura 17 - Efeito do 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -diidroxivouacapano-17 $\beta$  oato de metila (F2) no biofilme de *Candida albicans* SC 5314.

### 5.5 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura

Através da Microscopia eletrônica de varredura foi possível visualizar alterações na parede celular fúngica das espécies planctônicas de *Candida* spp. que foram inibidas pela fração FrB, identificada como um diterpeno com esqueleto vouacapano isolado da semente de *Pterodon pubescens*.

Quando comparado ao controle, as imagens obtidas demonstraram que o diterpeno com esqueleto vouacapano alterou a morfologia da parede celular das leveduras em todas as espécies analisadas, provocando agregação entre as células, irregularidades na superfície celular e formação de hifas, como pode ser visto nas Figuras 18 a 31.

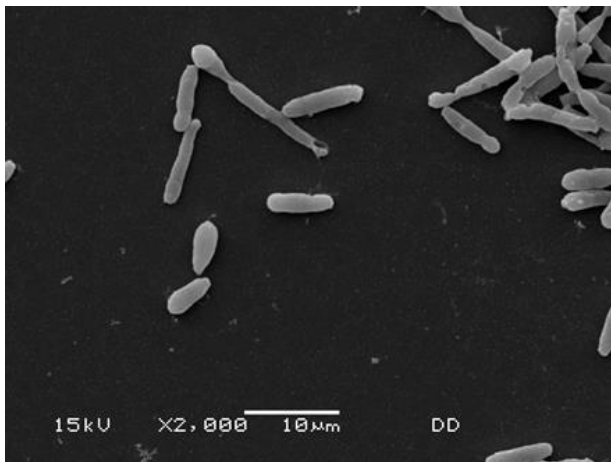


Figura 18 – Controle de *C. krusei*. Aumento de 2.000x

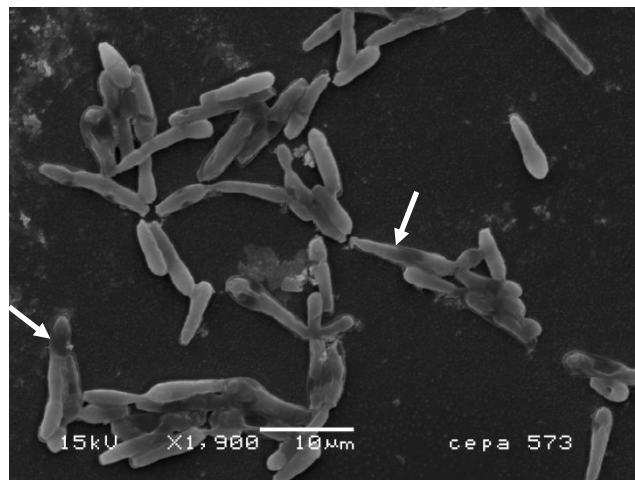


Figura 19 – Efeito do diterpeno com esqueleto vouacapano na cepa *C. krusei* (1mg/mL). Parede celular com irregularidades e células eletrondensas (setas). Aumento de 1.900x.

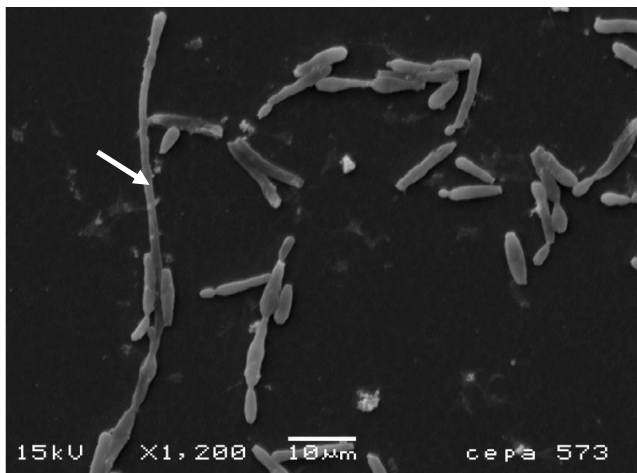


Figura 20 - Efeito do diterpeno com esqueleto vouacapano (1mg/mL) em *C. krusei*, Observa-se a formação de hifas extensas (seta). Aumento de 1.200x.

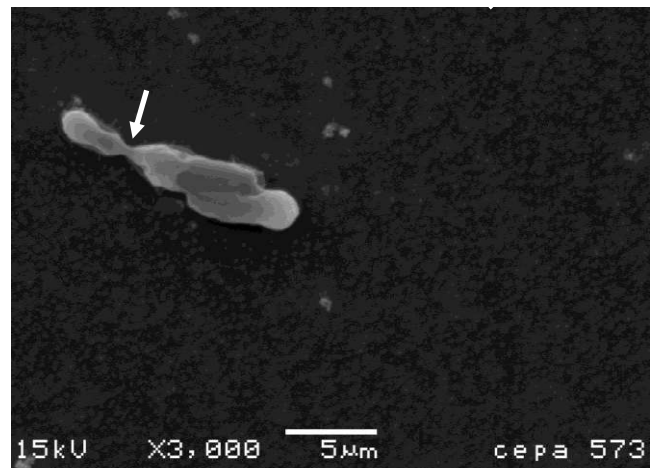


Figura 21- Efeito do diterpeno com esqueleto vouacapano (1mg/mL) em *C. krusei*. Aumento de 3.000x para verificar irregularidades na parede celular (seta).

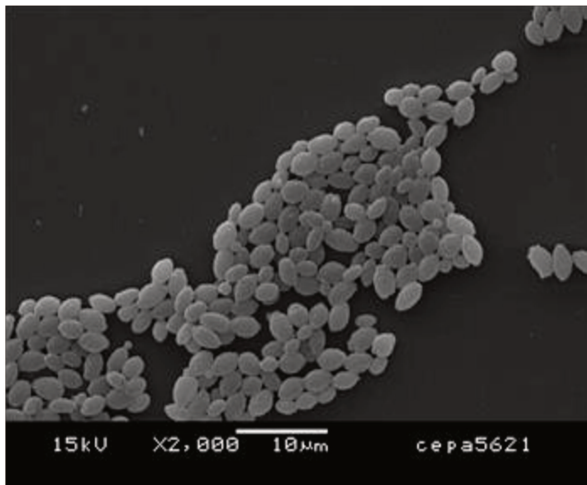


Figura 22 – Controle de *C. albicans*. Células ovais, parede celular regular. Aumento de 2.000x.

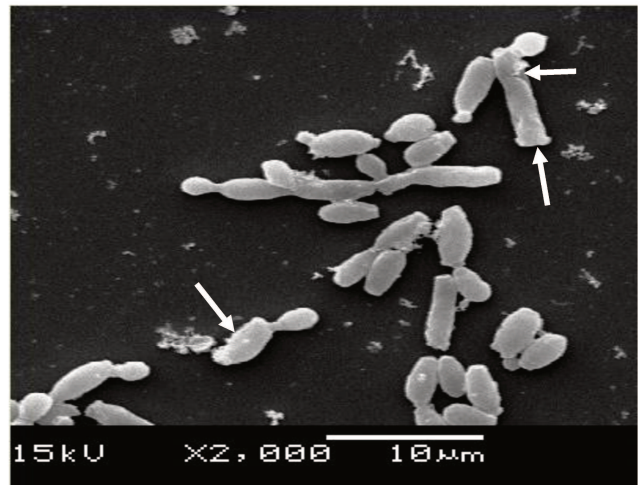


Figura 23- Efeito do diterpeno com esqueleto vouacapano em *C. albicans* (1mg/mL). Células alongadas e irregularidades na parede celular (setas). Aumento de 2.000x.

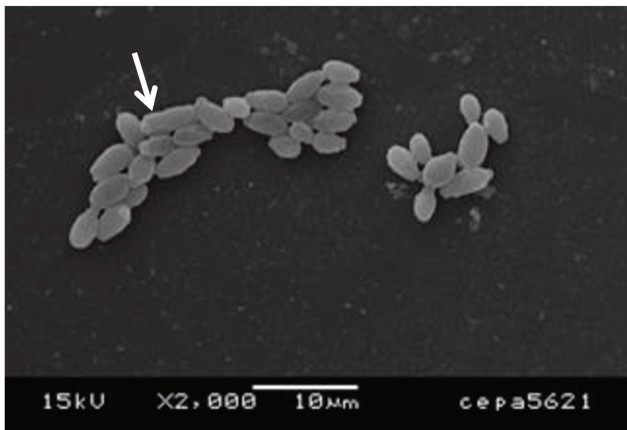


Figura 24 – Efeito do diterpeno com esqueleto vouacapano em *C. albicans*. Células alongadas e agregadas. (seta). Aumento de 2.000x.

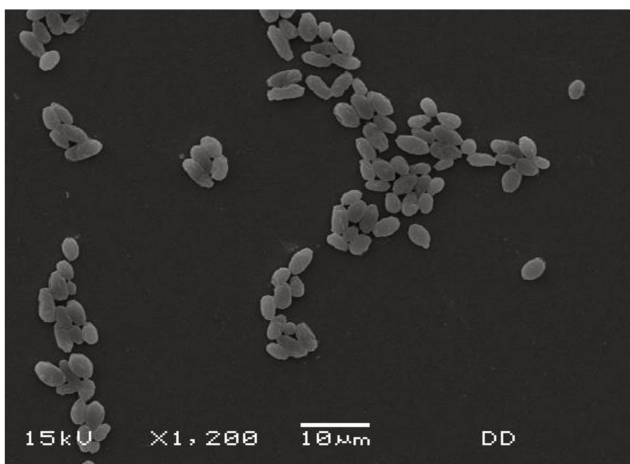


Figura 25- Controle de *C. tropicalis*. Células ovais e com superfície regular. Aumento de 1.200x.

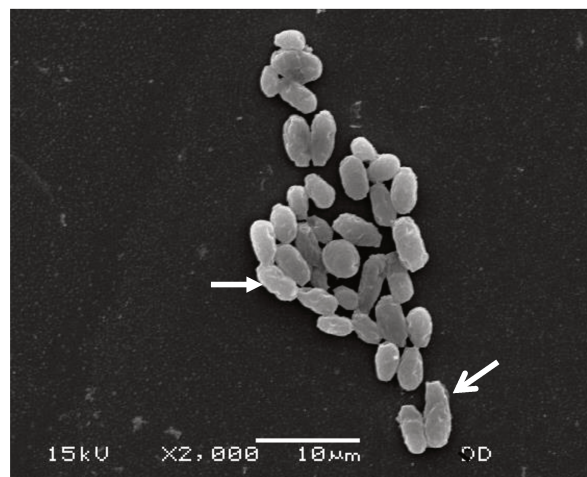


Figura 26- Efeito do diterpeno com esqueleto vouacapano (1 mg/mL) em *C.tropicalis*. Células disformes e com superfície da parede celular irregular (setas). Aumento de 2.000x.

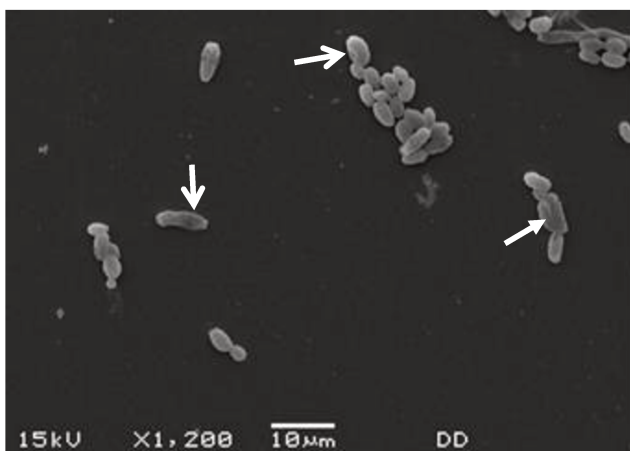


Figura 27 - Efeito do diterpeno com esqueleto vouacapano em *C. tropicalis* (1mg/mL). Irregularidades na parede celular (setas). Aumento de 1.200x.

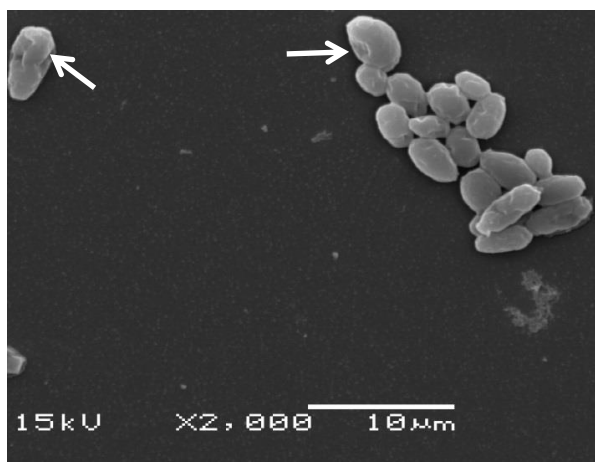


Figura 28 - Efeito do diterpeno com esqueleto vouacapano (1 mg/mL) em *C. tropicalis*. Irregularidades na parede celular. Aumento de 2.000x.

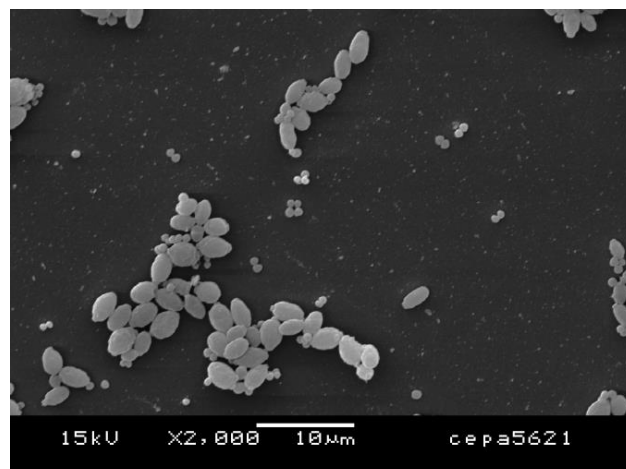


Figura 29 – Controle de *C. glabrata*. Células ovais e superfície regular. Aumento de 2.000x.

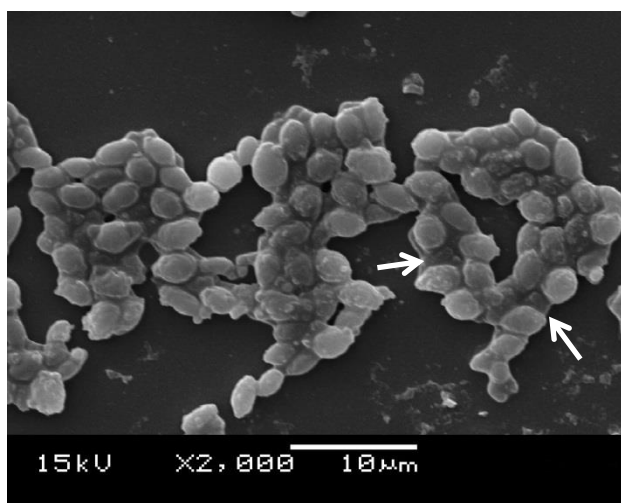


Figura 30 - Efeito do diterpeno com esqueleto vouacapano (1mg/mL) em *C. glabrata*, células aglomeradas e irregulares (setas). Aumento de 2.000x.

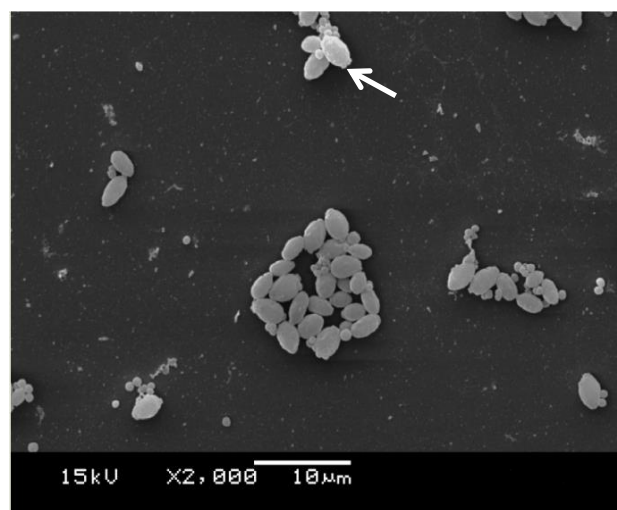


Figura 31 - Efeito do diterpeno com esqueleto vouacapano (1 mg/mL) em *C. glabrata* após 24 horas (seta). Aumento de 2.000x.

### 5.6 Análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Os resultados confirmam as modificações provocadas pelo vouacapano isolado de *P. pubescens* na estrutura da parede e na membrana celular fúngica, como má-formação e espessamento da parede celular, alterações no formato da célula e irregularidades visualizadas por MEV (Figuras 32 a 46).

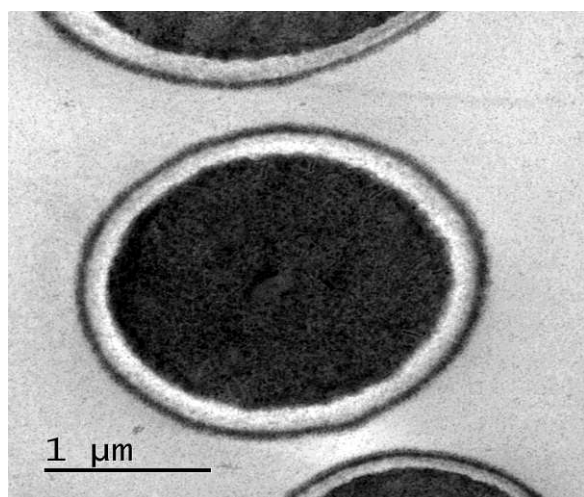


Figura 32 – Controle de *C. albicans*. Parede e membrana celular regular e em formato oval.

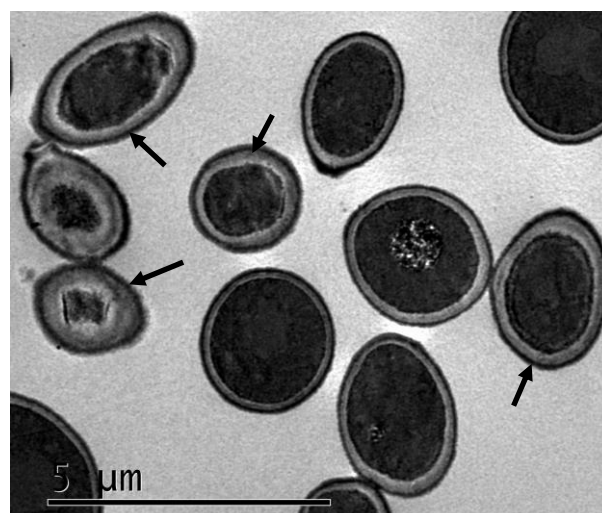


Figura 33- Efeito do diterpeno com esqueleto vouacapano em *C. albicans* (1mg/mL). Células com espessamento da parede celular (setas).

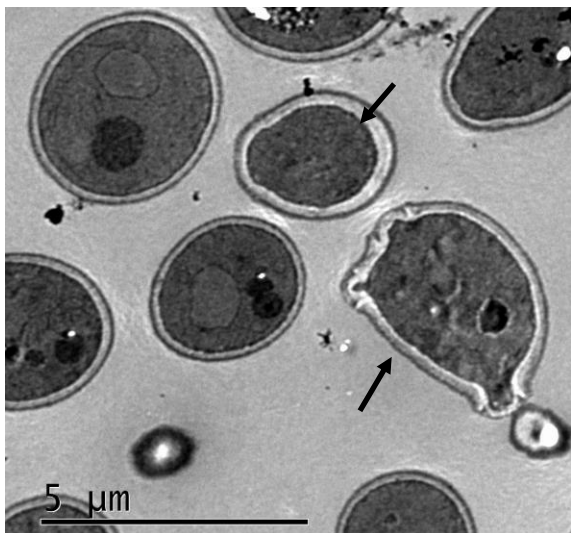


Figura 34 - Efeito do diterpeno com esqueleto vouacapano em *C. albicans* (1mg/mL). Células com formato irregular e espessamento da parede celular (setas).

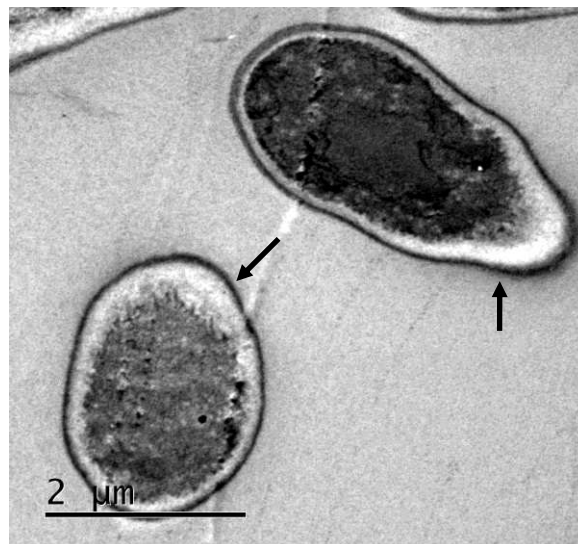


Figura 35 - Efeito do diterpeno com esqueleto vouacapano em *C. albicans* (1mg/mL). Células com formato irregular e espessamento da parede celular (setas).

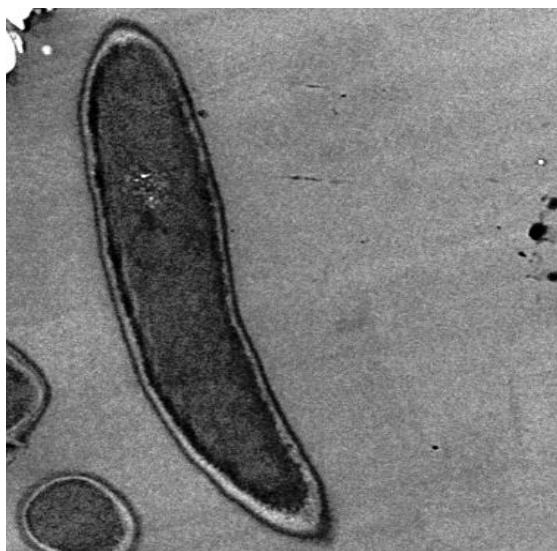


Figura 36 - Controle de *C. krusei*.

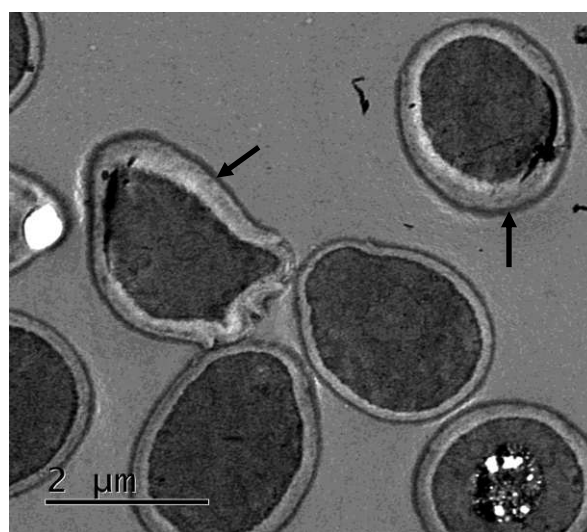


Figura 37 - Efeito do diterpeno com esqueleto vouacapano em *C. krusei* (1mg/mL). Parede celular irregular e espessa (setas).



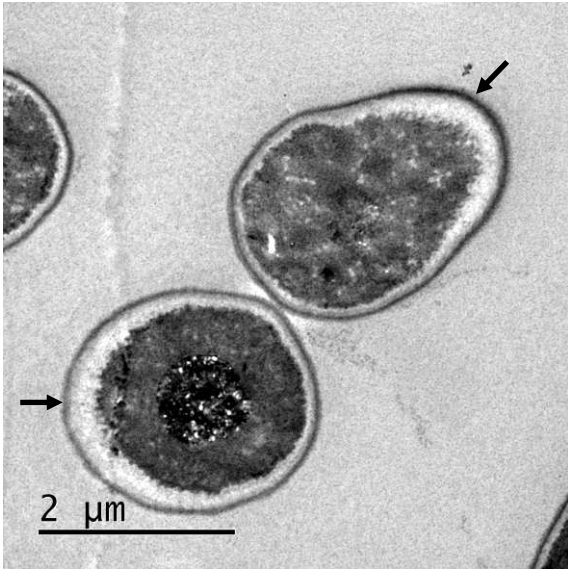


Figura 38 - Efeito do diterpeno com esqueleto vouacapano em *C. krusei* (1mg/mL). Espessamento da parede celular e células irregulares (setas).

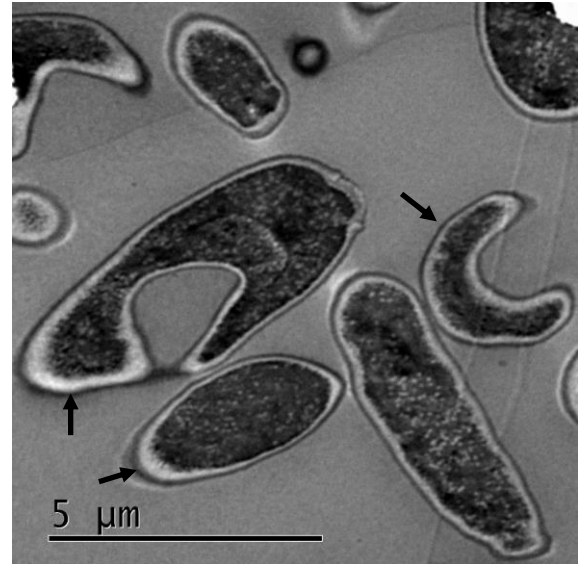


Figura 39 - Efeito do diterpeno com esqueleto vouacapano em *C. krusei* (1mg/mL). Células com formato irregular (setas).

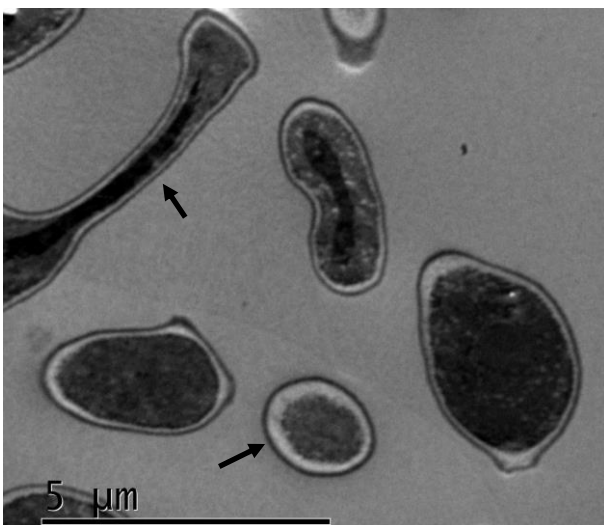


Figura 40 - Efeito do diterpeno com esqueleto vouacapano em *C. krusei* (1mg/mL). Células irregulares (setas).

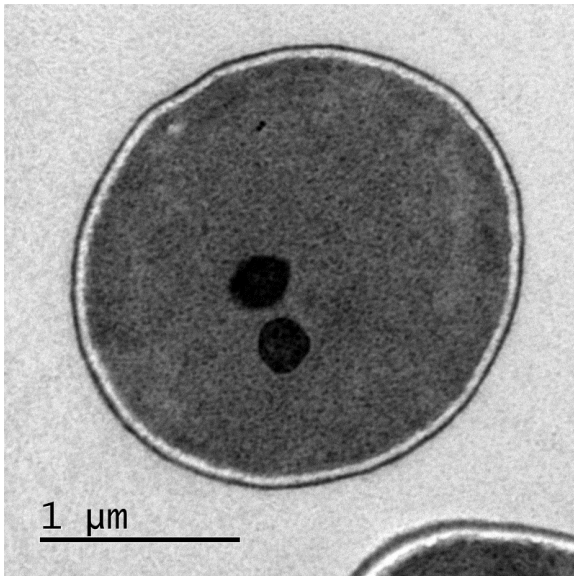


Figura 41 – Controle de *C. glabrata*.

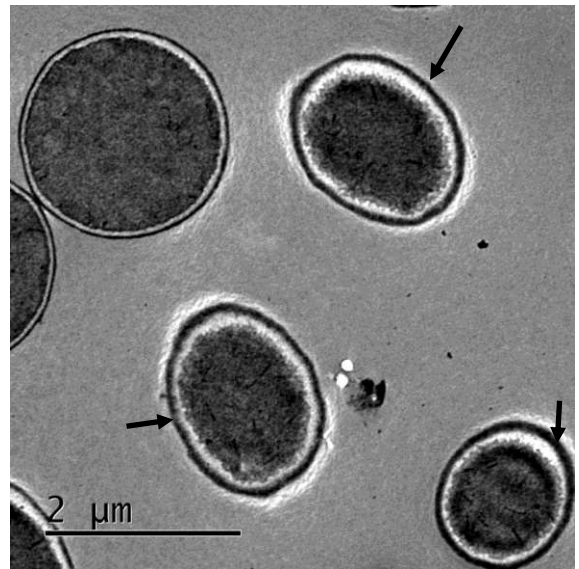


Figura 42 – Efeito do diterpeno com esqueleto vouacapano em *C. glabrata*. Espessamento da parede celular.

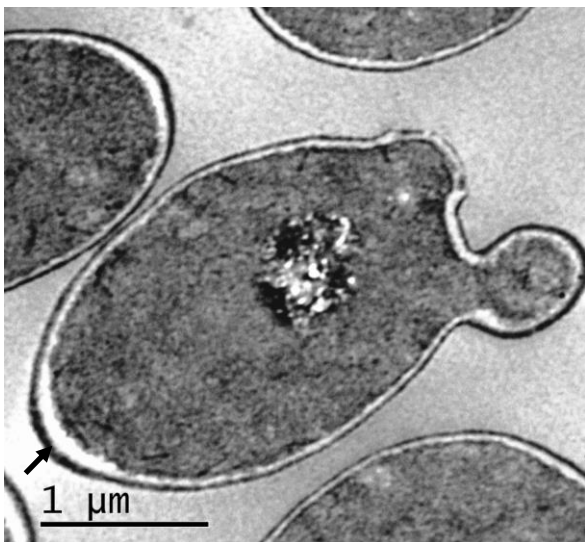


Figura 43 – Efeito do diterpeno com esqueleto vouacapano em *C. glabrata*. Espessamento da parede celular (seta).

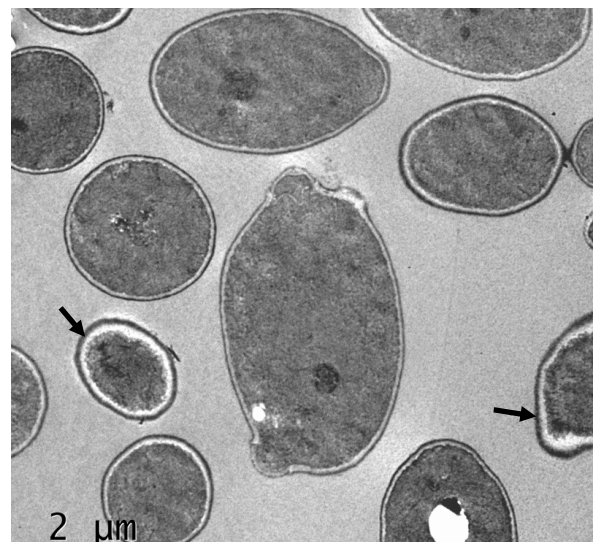


Figura 44 – Efeito do diterpeno com esqueleto vouacapano em *C. glabrata*. Parede celular espessa (setas).

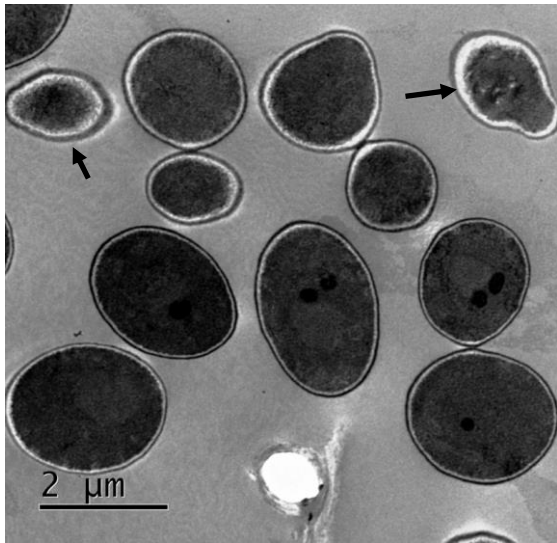


Figura 45 – Efeito do diterpeno com esqueleto vouacapano em *C. glabrata*. Espessamento da parede celular (setas).

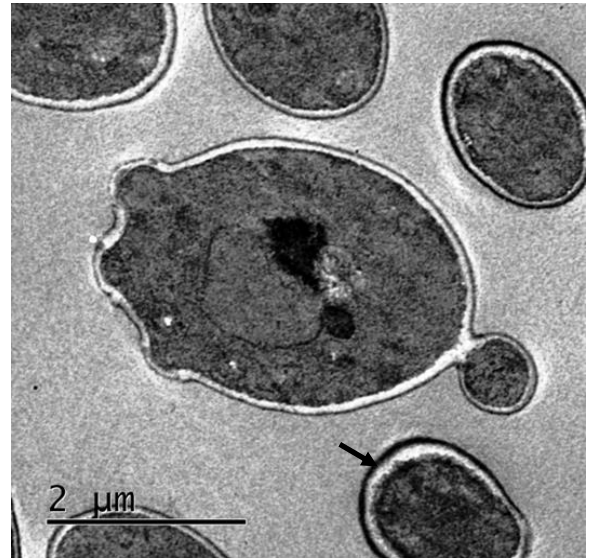


Figura 46 – Efeito do diterpeno com esqueleto vouacapano em *C. glabrata* (seta).

## 6. DISCUSSÃO

A busca por agentes antimicrobianos tornou-se o objetivo de muitos grupos de pesquisa, orientados para a descoberta da química e farmacologia de plantas (Potterat e Hamburger, 2008; Gertsch, 2011).

As plantas medicinais sintetizam vários compostos que são biologicamente ativos e grande parte deles são produtos do metabolismo secundário, relacionados com a interação da planta com o meio ambiente. Extratos obtidos de uma única espécie ou misturas são registradas e disponíveis comercialmente como drogas botânicas (Kong *et al.*, 2009).

Cerca de metade dos medicamentos utilizados são derivados de fontes naturais (Clark, 1996; Bakkali *et al.*, 2008). De modo geral, as plantas produzem uma infinidade de compostos, como alcaloides (Agrawal *et al.*, 1990), flavonoides (Bustamante *et al.*, 2010), lactonas (Euzébio *et al.*, 2011), furanoditerpenos (Spíndola *et al.*, 2010) e sesquiterpenos (Miranda *et al.*, 2013), que têm sido empregados como substâncias no tratamento de doenças infecciosas.

No Brasil, a sucupira é uma planta extensivamente estudada em pesquisas que buscam as propriedades farmacológicas dos seus componentes, pois foi amplamente empregada na medicina popular com diversas finalidades, como tônico, no tratamento de bronquite, amigdalite (Arriaga *et al.*, 2000) e como estimulante do apetite (Mascaro *et al.*, 2004; Bustamante *et al.*, 2010).

Com base nesses dados e no relato de pesquisas encontradas na literatura com óleo da sucupira, o objetivo desta pesquisa foi verificar a atividade antimicrobiana dos constituintes químicos obtidos do óleo da semente de *Pterodon pubescens*, através do isolamento e identificação dos componentes bioativos, como diterpeno com esqueleto vouacapano (figura 9), 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -diidroxivouacapano-17 $\beta$  oato de metila (Figura 10), geranilgeraniol (Figura 11), e os ésteres 6 $\alpha$ -hidroxi-7 $\beta$ -acetoxi-vouacapano-17 $\beta$ -oato de metila e acetoxi-7 $\beta$ -hidroxi-vouacapano-17 $\beta$ -oato de metila (Figura 12), compostos que já foram isolados e identificados por outros pesquisadores (Campos *et al.*, 1994; Pimenta *et al.*, 2006; Vik *et al.*, 2007; Spíndola *et al.*, 2010; Hoscheid *et al.*, 2012).

Através da extração com Soxhlet foi obtido o extrato bruto (101,6 gramas), sendo sequencialmente fracionado através de cromatografia líquida e de camada delgada, resultando nas frações demonstradas na Figura 6, que posteriormente foram identificadas por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de massas.

Os métodos cromatográficos realizados nessa pesquisa são os meios de separação e isolamento mais utilizados para fins de identificação e para análise de misturas e compostos isolados (Hosheid *et al.*, 2012).

As frações resultantes (Figura 6) foram testadas em células planctônicas bacterianas (Tabela 3) e *Candida spp.* (Tabela 4), verificando-se a concentração inibitória mínima através do método de microdiluição (CLSI, 2002) partindo-se da concentração inicial de 2mg/mL. Os resultados demonstraram que na máxima concentração testada, apenas a fração FrB (diterpeno com esqueleto vouacapano) apresentou atividade fungicida sobre as cepas planctônicas de *Candida spp.* Em bactérias, nenhum dos quatro compostos tiveram atividade, corroborando com dados obtidos por Vik *et al.* (2007) e Kubo *et al.* (1993) para o geranilgeraniol, uma vez que estes autores também observaram que este composto foi inativo para *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*.

Alguns trabalhos realizados com o extrato bruto da sucupira confirmam seu potencial uso como antimicrobiano. Bustamante *et al.* (2010) relataram a atividade bactericida e fungicida do extrato bruto etanólico da casca de *Pterodon spp.* para *S. aureus* e *C. albicans* (CIM 0,74mg/mL). Já Dutra *et al.* (2008) verificaram que o óleo da semente não foi ativo para *C. albicans* e teve fraca atividade bacteriana para *S. aureus* (CIM de 2,5mg/mL), no entanto, os compostos testados denominados de frações hexânica, butanólica e metanólica, não foram isolados e identificados nesses estudos.

Baseado em estudos que relacionam a atividade de compostos obtidos de plantas aromáticas e medicinais e ação antimicrobiana, Duarte *et al.* (2005) estabeleceram que compostos com CIM de até 0,5 mg/mL possuem forte atividade antimicrobiana, CIM entre 0,6 e 1,5 mg/mL são considerados com atividade moderada e acima de 1,5 mg/mL são considerados como baixa atividade antimicrobiana. Com base nesses dados e nos testes com o antifúngico comercial nistatina, (CIM = 0,5 mg/mL), podemos considerar que, dos compostos testados, apenas o diterpeno com esqueleto vouacapano teve atividade fungicida, sendo capaz de inibir o crescimento de diferentes

espécies de *Candida spp.*, porém, com atividade antifúngica baixa com base nos valores de CIM = 2mg/mL (Tabela 6).

Essas diferenças podem ser explicadas por estudos de Gobbo-Neto e Lopes (2007) os quais afirmam que os constituintes químicos presentes nas plantas medicinais podem diferir devido a vários fatores como a época da coleta, o estágio de desenvolvimento da planta e variações na temperatura. Dessa forma, uma mesma população de plantas morfológicamente indiferenciadas e sexualmente compatíveis, podem apresentar óleos com composição química e aroma distinto (Gobbo Neto e Lopes, 2007; Paula *et al.*, 2011).

De modo geral, esses dados demonstram que substâncias presentes em extratos de plantas apresentam potencial atividade antimicrobiana, fato amplamente observado na literatura. No entanto, os resultados discrepantes se devem às diferenças na metodologia empregada na extração, purificação e isolamento dos compostos, como o tipo de solvente empregado, sua concentração, e também os efeitos sazonais que influenciam no conteúdo a ser extraído.

As modificações provocados na parede celular de *Candida spp.*, foram visualizadas através de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) e comparando-se as imagens das células tratadas com as imagens do controle (morfologia oval, parede celular regular e contínua, membrana celular mais fina). Os resultados demonstraram que o diterpeno com esqueleto vouacapano provocou alterações na morfologia das células planctônicas de *Candida spp.* As Figuras 18 a 46 demonstram que esse composto provocou formações de hifas em *C. krusei* (Figura 19), deformações e descontinuidade na parede celular (Figuras 19, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 28, 31), aglomerações celulares em *C. glabrata* (Figura 30), alterações no formato da célula e espessamento da parede celular (Figuras 33, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 46). Esses dados sugerem que o vouacapano pode ter reagido com um componente da parede celular de *Candida spp.*, entre eles o ergosterol (Gow e Hube, 2012) que não está presente na parede celular bacteriana, o que justificaria seu efeito bactericida negativo.

Alguns trabalhos relatam os danos na parede celular fúngica por monoterpenos obtidos de óleos essenciais e sugerem que o óleo pode afetar a biossíntese do ergosterol, a absorção de esteroides, o metabolismo lipídico, e a estrutura da parede celular fúngica (Paveern *et al.*, 2004), corroborando com os resultados

apresentados nesse estudo, no qual foram verificadas alterações provocadas na parede celular de *Candida* spp., visualizadas através de MEV e MET.

Aníbal (2010) observou alterações provocadas pelos extratos do pericarpo e da casca de *Punica granatum* em células de *Candida* spp. como espessamento e má-formação da parede celular similar a encontrada nessa pesquisa. Nesse aspecto, a ação de óleos ou compostos isolados de plantas é amplamente estudada em espécies de *Candida* spp. sendo observada ampla sensibilidade desse microrganismo frente aos compostos naturais (Aligiannis *et al.*, 2001; Lima *et al.*, 2006; Aníbal, 2010; Agarwal *et al.*, 2010).

Em relação aos outros dois compostos testados, F2 (6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -diidroxivouacapano-17 $\beta$  oato de metila) e 404 (ésteres 6 $\alpha$ -hidroxi-7 $\beta$ -acetoxivouacapano-17 $\beta$ -oato de metila e acetoxi-7 $\beta$ -hidroxi-vouacapano-17 $\beta$ -oato de metila), o F2 inibiu o crescimento de *C. glabrata* somente nas primeiras 24 horas e se mostrou inativo após 48 horas, sendo necessário este tempo de crescimento para confirmar que o composto foi capaz de agir sobre o microrganismo testado. Já o composto 404 apresentou efeito negativo após 24 e 48 horas, em todas as cepas fúngicas e bacterianas testadas. Apesar de F2 e 404 não apresentarem atividade antimicrobiana contra *Candida* spp, *S. aureus* e *S. mutans*, alguns trabalhos que isolaram esses mesmos compostos de *Pterodon* spp., relatam outras atividades biológicas relacionadas a eles, como atividade antinociceptiva (Duarte *et al.*, 1996) e antiinflamatória (Galceran *et al.*, 2011), o que indica que os efeitos de compostos bioativos de extratos de plantas são diversificados e podem agir de modo específico para diversas finalidades farmacológicas.

Todos os compostos também foram testados em biofilme de *C. albicans*, sendo que a leitura do biofilme foi feita utilizando-se o corante XTT, que mede a atividade metabólica das células. Baseado nos trabalhos de Duarte *et al.* (2005) acima citado, os resultados demonstraram que, dos quatro compostos, somente o vouacapano e o geranilgeraniol apresentaram atividade inibitória no biofilme fúngico de *C. albicans* nas concentrações de 1mg/mL e entre 2 e 4 mg/mL, respectivamente, demonstrando atividade moderada para ambos os compostos (Figuras 14 e 15).

De acordo com Chandra *et al.* (2001) a formação do biofilme de *Candida albicans* pode ocorrer em 6 horas sendo esta a fase inicial, e com 24 horas o biofilme já

está na fase de multiplicação e formação do polissacarídeo extracelular, sendo que a maturação ocorre entre 48 e 72 horas. Com base nessas fases de formação do biofilme, os resultados obtidos para o diterpeno com esqueleto vouacapano e o geranilgeraniol após 24 horas sugerem uma ação durante a formação da camada extracelular de polissacarídeos no biofilme fúngico, a qual age como uma barreira na difusão de antimicrobianos (Chandra *et al.*, 2001). Dessa forma, podemos considerar que os compostos testados na presente pesquisa impediram a formação dessa camada de polissacarídeos.

Entre os efeitos ocasionados por compostos extraídos de plantas nos mecanismos de formação do biofilme, podemos citar os danos na estrutura da membrana celular (Cox *et al.*, 2000), modificações na hidrofobicidade da parede celular (Turi *et al.*, 1997) e modificações no mecanismo de “quorum sensing” (Gao *et al.*, 2003), o qual é responsável por modular o desenvolvimento, crescimento e dispersão do biofilme (Hogan, 2006).

Os compostos diterpeno com esqueleto vouacapano e geranilgeraniol demonstraram moderada atividade sobre o biofilme em formação e apesar de não terem apresentado grande atividade fungicida e/ou fungistática, visto que, a formação do biofilme é um mecanismo de escape dos microrganismos aos antimicrobianos e uma forma de transmissão de resistência microbiana, seria interessante a princípio ampliar as pesquisas com o diterpeno com esqueleto vouacapano e geranilgeraniol com ênfase no mecanismo de ação desses compostos como agentes antimicrobianos.

Os constituintes químicos característicos das sementes do gênero *Pterodon* e testados na presente pesquisa foram diterpenos lineares (geranilgeraniol) ou tetracíclicos derivados vouacapânicos ou com um esqueleto vinhaticano (Campos *et al.*, 1994). Os terpenos formam diferentes classes estrutural e funcionalmente, os quais são formados de combinações de cinco carbonos. Os principais terpenos são os monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), hemiterpenos (C5), diterpeno (C20), sesterpenos (C25), triterpeno (C30) e tetraterpenos (C40) (Bakkali *et al.*, 2008). A atividade antimicrobiana de óleos de plantas se deve principalmente aos compostos fenólicos e terpenóides (Conner, 1993).

Os resultados aqui apresentados demonstram que os furanoditerpenos, com esqueleto vouacapano, têm de baixo a moderado potencial antifúngico, tanto em células



planctônicas quanto em células sésseis. Esses dados corroboram com outros trabalhos, os quais confirmam o potencial farmacológico desses compostos extraídos do óleo da semente de *Pterodon* (Nunan *et al.*, 1982; Carvalho *et al.*, 1999; Spíndola *et al.*, 2009; Spíndola *et al.*, 2010), com amplo espectro de atividade biológica, entre elas atividade antibacteriana (Dutra *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2010), anticâncer (Spíndola *et al.*, 2009), fungicida e anti-biofilme, conforme observado no presente estudo. Outras atividades também tem sido relacionadas ao geranilgeraniol, como ação contra proliferação intracelular de formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Menna-Barreto *et al.*, 2008) e atividade antimicrobiana contra *Mycobacterium tuberculosis* (Vik *et al.*, 2007).

Nesse contexto, podemos considerar a importância de se ampliar os estudos nessa linha de investigação, visando o emprego de novas metodologias de extração de substâncias químicas potencialmente bioativas, assim como testes biológicos para verificar o alvo de ação desses compostos nos microrganismos, visto que a literatura demonstra uma ampla diversidade de compostos presentes no óleo da semente de *Pterodon*, que podem apresentar propriedades diversas para o tratamento de várias patologias. Espera-se que os compostos naturais tenham diferentes alvos de ação em relação aos antimicrobianos comerciais e com o qual alguns microrganismos já adquiriram resistência.

Salienta-se que o desenvolvimento de estudos que visam à produção de medicamentos, tendo essas plantas como matéria-prima, também necessita de mais pesquisas voltadas para avaliar a toxicidade desses componentes na célula animal, parâmetro importante a ser investigado para aplicação de substâncias alternativas na cura e inibição de efeitos nocivos para o homem.

Nesse aspecto, nos últimos anos, o interesse pela sucupira tem aumentado consideravelmente e o efeito biológico de diferentes extratos e metabólitos puros tem sido investigado em alguns modelos *in vivo* e *in vitro* (Hansen *et al.*, 2010). Em estudos realizados por Sabino *et al.* (1999), verificaram que o óleo da semente não foi citotóxico para células sanguíneas mononucleares humanas, não mutagênico e não tóxico em camundongos, após administração de doses superiores do que geralmente é ingerida pelos seres humanos. Dessa forma, amplia-se as perspectivas quanto ao uso do óleo da semente para produção de fármacos. Mesmo assim, mais estudos devem ser levados a

efeito para avaliar a toxicidade do óleo e dos componentes isolados e estabelecer os limites confiáveis de dosagens a serem administradas, por essas substâncias.

Algumas técnicas tem sido desenvolvidas para um futura produção de fármacos a base de compostos extraídos de *Pterodon* spp., entre elas podemos citar a microencapsulação dos compostos extraídos da sucupira, sendo esta uma forma de aumentar seu tempo de vida útil e no futuro ser produzido pela indústria farmacêutica (Servat *et al.*, 2012).

De acordo com Cordell *et al.* (2000), é fato importante que alguns compostos podem apresentar um potencial terapêutico limitado, porém podem ser usados como matéria-prima para a produção de medicamentos semi-sintéticos com atividade farmacológica pronunciada. Com base nesses dados, acredita-se que seja necessário realizar mais testes farmacológicos em animais, para verificar o alvo de ação citotóxica desses componentes na célula, os quais demonstram capacidade de inibição de microrganismos patogênicos e que se tornaram resistentes aos antimicrobianos comerciais disponíveis.

Os dados apresentados por esta pesquisa, demonstram o potencial antifúngico e anti-biofilme em *Candida* spp. do óleo de *Pterodon pubescens* e abrem perspectivas para a exploração dos efeitos em células humanas e em modelos de infecção em animais, para futuramente ser utilizado no tratamento de doenças superficiais e sistêmicas causada por *Candida* spp.

## 7. CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos na presente pesquisa, podemos concluir que:

1. Os compostos geranilgeraniol e diterpeno com esqueleto vouacapano isolados do óleo da semente de *Pterodon pubescens* têm atividade antifúngica baixa (2mg/mL) em células planctônicas de *Candida* spp.;
2. Esses compostos demonstram efeito antimicrobiano inibitório moderado (1mg/mL) em biofilme de *Candida albicans*;
3. Modificações celulares são observadas nas células planctônicas de *Candida* spp., como irregularidades na parede celular, aglomerações celulares, formação de hifas e espessamento da parede celular;
4. Os compostos vouacapano, 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -diidroxivouacapano-17 $\beta$  oato de metila, geranilgeraniol, e os ésteres 6 $\alpha$ -hidroxi-7 $\beta$ -acetoxi-vouacapano-17 $\beta$ -oato de metila e 6 $\alpha$ -acetoxi-7 $\beta$ -hidroxi-vouacapano-17 $\beta$ -oato de metila não têm atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *S. mutans*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005; (43): 5721-32.

Agrawal PK, Thakur RS, Bansal MC. Carbon-13 NMR of Flavonoids. Elsevier: Amsterdam. *J Org Chem.* 1990, 55: 2380.

Agarwal V, Lal P, Pruthi V. Effect of Plant Oils on *Candida albicans*. *J Microbiol Immunol Infect.* 2010; 43(5): 447–51.

Agra MF, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Braz J of Pharmacol.* 2007; 17(1): 114-40.

Aliogiannis N, Kalpoutzakis E, Chinou IB, Mitakou S, Gikas E, Tsaibopoulos A. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of five taxa of *Sideritis* from Greece. *J Agric Food Chem.* 2001; 49 (2): 811-15.

Almeida EC, Menezes H. Anti-inflammatory activity of propolis extracts. *J Venom Anim Toxins.* 2002; 8(2): 5-8.

Almeida RS, Brunke S, Albrecht A, Thewes S, Laue M, Edwards JE *et al.* The hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. *PLoS Pathog.* 2008; (4): 11.

Almeida RS, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* iron acquisition within the host. *FEMS Yeast Res.* 2009; 9(7): 1000-12.

Anaissie E. Opportunistic mycoses in the immunocompromised host: Experience at a cancer center and review. *Clin Infect Dis.* 1992; (14): 43-53.

Anderson GG, O'Toole GA. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008; (322): 85–105.

Aníbal P. Estudo da composição química e ação inibitória dos extratos obtidos de *Punica granatum L.* (romã) sobre *Candida* spp. [tese]. Piracicaba UNICAMP/FOP; 2010.

Arriaga MCA, Castro MAB, Silveira ER, Braz-Filho R Further Diterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeflorus*. *J Braz Chem Soc*. 2000; 11(2): 187-90.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chem Toxic*. 2008; (46): 446-75.

Barrett AJ, Rawlings ND. Types and families of endopeptidases. *Biochem Soc Trans*. 1991; 19 (3): 707-15.

Bergman J. Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*. 2006; (9): 595-601.

Berman J, Sudbery PE. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genetic*. 2002; (3): 918-30.

Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol*. 2006; (9): 588-94.

Bonach GA, Foster TJ. *Staphylococcus aureus* exotoxins. In: Gram positive bacterial pathogens. Fischetti VA, Novick RP, Feretti JJ, Portnoy DA, Rood JI, editores. American Society for Microbiology: Washington DC; 2000. p. 367-78.

Borghi E, Sciota R, Biassoni C E, Cirasola D, Cappelletti L, Vizzini L. Cell surface hydrophobicity: a predictor of biofilm production in *Candida* isolates? *J Med Microbiol*. 2011; 60(5): 689–90.

Braz Filho R, Gottlieb OR, Viegas ARM. A química de leguminosas XXVIII: as isoflavonas de *Pterodon pubescens*. In: Anais da Academia Brasileira de Ciências, 1970; v. 42, p. 111-13.

Brown AJ. Morphogenetic signaling pathways in *Candida albicans*. In: Calderone R. *Candida and candidiasis*. Washington, DC: ASM Press; 2002. p. 95-106.

Brown GD, Denning DW, Levitz SM. Tackling human fungal infections. *Science*. 2012; 336(6082): 647. doi: 10.1126/science.1222236.

Budtz-Jorgensen E. Candida - associated denture stomatitis and angular cheilitis. Oral Candidosis In: Samaranayake LP, MacFarlane TW editores. London. 1990; 156-83.

Bustamante KGL, Lima ADF, Soares ML, Fuiza TS, Tresvenzol LMF, Bara MTF *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto da casca da sucupira branca (*Pterodon emarginatus*-Vogel)- Fabaceae. Ver Bras Pl Med. 2010; 12(6): 341-45.

Calderone RA. Candida and Candidiasis. ASM Press, American Society for Microbiology. Washington DC; 2002.

Campos AM, Silveira ER, Braz-Filho R, Teixeira TC. Diterpenoids from *Pterodon polygalaeflorus*. Phytochem. 1994; 36(2): 403-6.

Carvalho JCT, Sertié JAA, Barbosa MJCT, Patrício KCM, Caputo LRG, Sarti SJ *et al.* Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. J of Ethnopharmacol. 1999; (64): 127-33.

Catão RMR, Antunes RMP, Arruda TA, Pereira MS, Higino JS, Alves JA *et al.* Atividade antimicrobiana in vitro do extrato etanólico de *Punica granatum* linn (romã) sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. RBAC. 2006; 38(2): 111-14.

Chaffin WL, Lopez-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martinez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. Microbiol Mol Biol Rev. 1998; 62(1): 130-80.

Challacombe SJ. Immunologic aspects of oral candidiasis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1994; (78): 202-10.

Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. J Bacteriol. 2001; (183): 5385-94.

Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms. Nat Protoc. 2008; 3(12): 1909-24.

Clark AM. Natural products as a resource for new drugs. Pharm Research. 1996; (13): 1133-44.

Chen YL, Huang ST, Sun FM, Chiang YL, Chiang CJ, Tsai CM *et al.* Transformation of cinnamic acid from trans- to cis-form raises a notable bactericidal and synergistic activity against multiple-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *European J of Pharma Sciences*. 2011; 43(3): 188-94.

CLSI (2002). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard. Clinical and Laboratorial Standards Institute. 2 ed. CLSI Norma M27-A2, v.22, n.15.

CLSI (2003). Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada. Clinical and Laboratorial Standards Institute. 3 ed. CLSI Norma M7-A6, v.23, n.2.

Coelho MGP, Marques PR, Gayer CR, Vaz LC, Neto JF, Sabino KC. Subacute toxicity evaluation of a hydroalcoholic extract of *Pterodon pubescens* seeds in mice with collagen-induced arthritis. *J of Ethnopharmacol*. 2001; (77): 159-64.

Coelho LP, Reis PA, Castro FL, Gayer CR, Silva Lopes C, Silva MCC *et al.* Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. *J of Ethnopharmacol*. 2005; (98): 109-16.

Conner DE. Naturally occurring compounds. In: Davidson P, Branen AL, eds. *Antimicrobials in Foods*. New York: Marcel Dekker, 1993:441-68.

Cordell GA. Biodiversity and drug Discovery a symbiotic relationship. *Phytochem*. 2000; 55 (6): 463-80.

Correa MP. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas. Imprensa Nacional/MA-IBDF. Rio de Janeiro; 1978; p.153.

Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 1999; 12(4): 564-82.

Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR *et al.* The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol*. 2000; (88): 170-75.

Cuéllar-Cruz M, Lopez-Romero E, Villagómez-Castro JC, Riuz-Baca E. *Candida* species: new insights into biofilm formation. *Future Microbiol.* 2012; 7(6): 755-71.

Davey ME, Costerton JW. Molecular genetics analyses of biofilm formation in oral isolates. *Periodontol.* 2006; (42): 13-26.

DeLeo FR, Chambers HF. Reemergence of antibiotic-resistant 575 *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *J Clin Invest.* 2009; (119): 2464-74.

D'enfert C. Biofilms and their role in the resistance of pathogenic *Candida* to antifungal agents. *Curr Drug Targets.* 2006; (7): 465-70.

Di Pasqua R, De Feo V, Villani F, Mauriello G. In vitro antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean Apiaceae, Verbenaceae and Lamiaceae against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Ann Microbiol.* 2005; (55): 139-43.

Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15: 167-93.

Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* 2003; (11): 30-6.

Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.* 2003; (5): 1213-19.

Drona F, Alonso-Sanz M, Laguna F, Chaves F, Martínez-Suárez JV, Rodríguez-Tudela JL *et al.* Clinical significance of mixed oropharyngeal candidiasis due to *Candida albicans* and non-*albicans* strains in HIV-infected patients. In: Orlando, FL. Program and Abstracts of the Thirty-Fourth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy [Abstract 1215]. American Society for Microbiology, Washinton: DC. 1994. p. 212.

Duarte IDG, Alves DLF, Veloso DP, Nakamura-Crag M. Evidence of involvement of biogenic amines in the antinociceptive effects vouacapan extrated from *Pterodon polygalaeflorus* Benth. *J from Ethnopharmacol.* 1996; (55): 13-8.

Duarte MCT, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VLG, Delarmelina C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *J of Ethnopharmacol.* 2005; (97): 305–11.



Dutra RC, Leite MN, Barbosa NR. Quantification of Phenolic Constituents and Antioxidant Activity of *Pterodon emarginatus* Vogel seeds. *Int J Mol Sci.* 2008; 9(4): 606-14.

El-Azizi M, Khardori N. Factors influencing adherence of *Candida* spp. to host tissues and plastic surfaces. *Indian J Exp Biol.* 1999; 37(10): 941-51.

El Azizi MA, Starks SE, Khardori N. Interactions of *Candida albicans* with other *Candida* spp. and bacteria in the biofilms. *J Appl Microbiol.* 2004; (96): 1067-73.

Elgorashi EE, Drewes SE, Van Staden J. Organ-to-organ and seasonal variation in alkaloids from *Crinum macowanii*. *Fitoterapia.* 2002; (73): 490-95.

Ene IV, Adya AK, Wehmeier S, Brand AC, MacCallum DM, Gow NA *et al.* Host carbon sources modulate cell wall architecture, drug resistance and virulence in a fungal pathogen. *Cell Microbiol.* 2012; 14(9): 1319-35.

Euzébio FPG, Santos FJ, Piló-Veloso D, Ruiz AL, de Carvalho JE, Ferreira-Alves DL, *et al.* Effect of 6 $\alpha$ , 7 $\beta$ -dihydroxyvoucapan- 17 $\beta$ -oic acid and its lactone derivatives on the growth of human cancer cells. *Bioorganic Chemistry.* 2009; (37): 96-100.

Evans WC. *Trease and Evans' Pharmacognosy.* 14 ed. WB Saunders Company: London; 1996. p. 107-25.

Fascio M, Gilbert B, Mors WB, Nishida T. Two new diterpenes from *Pterodon pubescens*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências,* 1970; 42: 97-101.

Fascio M, Mors WB, Gilbert B, Mahajanc JR, Monteiro MB, Dos Santos Filho D, Vichnewskid W *et al.* Diterpenoid furans from *Pterodon* species. *Phytochem.* 1976; (15): 201-3.

Fleck CB, Schöbel F, Brock M. Nutrient acquisition by pathogenic fungi: nutrient availability, pathway regulation, and differences in substrate utilization. *Int J Med Microbiol.* 2011; (301): 400-7.

Flemming HC, Wingender J, Mayer C, Korstgens V, Borchard W. Cohesiveness in biofilm matrix polymers. In: Allison DG, Gilbert P, Lappin-Scott HM, Wilson M editores. Community structure and co-operation in biofilms. Cambridge: Cambridge University Press; 2000. p. 87-105.

Foster TJ, Hook M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol. 1998; (6): 484-88.

Fridkin SK, Edwards JR, Pichette SC, Pryor ER, McGowan JE Jr, Tenover FC *et al.* Determinants of vancomycin use in adult intensive care units in 41 United States hospitals. Clin Infect Dis. 1999; (28): 1119-25.

Galceran CB, Sertie JAA, Lima CS, Carvalho JCT. Anti-inflammatory and analgesic effects of 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroxy-vouacapan-17 $\beta$ -oic acid isolated from *Pterodon emarginatus* Vog. fruits. Inflammopharmacol. 2011; 19 (3): 139-43.

Gao M, Teplitski M, Robinson JB, Bauer WD. Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing. Mol. Plant-Microbe Interact. 2003; (16): 827-34.

Gershenzon J, Maffei M, Croteau R Biochemical and histochemical localization of monoterpene biosynthesis in the glandular Trichomes of spearmint (*Mentha spicata*). Plant Physiol. 1989; (89): 1351.

Gertsch J. Botanical drugs, synergy, and network pharmacology: forth and back to intelligent mixtures. Plant Med. 2011; 77(11): 1086-98.

Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Quim Nova. 2007; 30(2): 374-81.

González-Zorn B, Escudero JA. Ecology of antimicrobial resistance: humans, animals, food and environment. Int Microbiol. 2012; 15(3): 101-9.

Gow NA, Van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. Nat Rev Microbiol. 2011; (10): 112-22.

Gow NA, Hube B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Current Opinion in Microbiol.* 2012; 15(4): 406-12.

Grace SC, Logan BA, Adams WW. Seasonal differences in foliar content of chlorogenic acid, a phenylpropanoid antioxidant, in *Mahonia repens*. *Plant Cell Environ.* 1998; (21): 513-21.

Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2004; (2): 95-108.

Hansen D, Haraguchi M, Alonso A. Pharmaceutical properties of “sucupira” (*Pterodon* spp.) *Brazilian J Pharm Scienc.* 2010; 26(4): 607-16.

Hardy KJ, Hawkey PM, Gao F, Oppenheim BA. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the critically ill. *British J of Anaesthesia.* 2004; 92(1): 121-30.

Hartmann T. Global harmonization of herbal health claims. *Ent Exp Appl.* 1996; (80): 177-79.

Hawser SP, Douglas LJ. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun.* 1994; (62): 915-21.

Hawser SP, Baillie GS, Douglas LJ. Production of extracellular matrix by *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol.* 1998; 47(3): 253-56.

Höft M, Verpoorte R, Beck E. Leaf alkaloid contents of *Tabernaemontana pachysiphon* as influenced by endogenous and environmental factors in the natural habitat. *Plant Med.* 1998; 64(2): 52-148.

Hogan DA. Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryot Cell.* 2006; 5(4), 613-19.

Hornby JM, Jensen EC, Lise AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R *et al.* Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67(7): 2982-92.

Hoscheid J, Reinas A, Cortez DAG, Costa WF, Cardoso MLC. Determination by GC–MS–SIM of furanoditerpenes in *Pterodon pubescens* Benth. Development and validation. *Talanta*. 2012; (100): 372-76.

Hoyer LL, Green CB, Oh SH, Zhao X. Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family - a sticky pursuit. *Med Mycol*. 2008; (46): 1-15.

Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology*. 2001; (147): 1997-2005.

Janssen AM, Scheffer JJC, Baerheim SA. Antimicrobial activity of essential oils for Greek *Sideritis* species. *Pharmazie*. 1987; 12(8): 45-70.

Kim KJ, Yun HH, Jeong SI, Cha JD, Kim SM, You YO. Inhibitory effects of *Caesalpinia sappan* on growth and invasion of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol*. 2004; (91): 81-7.

Kleinberg I. A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causation: an alternative to *Streptococcus mutans* and the specific-plaque hypothesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002; 13(2): 108-25.

Knight GM, Budd EL, Whitney L, Thornley A, Al-Ghusein H, Planche T *et al*. Shift in dominant hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (HA-MRSA) clones over time. *J Antimicrob Chemother*. 2012; (67): 2514-22.

Kong DX, Li XJ, Zhang HY. Where is the hope for drug discovery? Let history tell the future. *Drug Discov*. 2009; 24(3-4): 115-19.

Krebes J, Al-Ghusein H, Feasey N, Breathnach A, Lindsay JA. Are nasal carriers of *Staphylococcus aureus* more likely to become colonized or infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on admission to a hospital? *J Clin Microbiol*. 2011; (49): 430-32.

Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002; (66): 486-505.

Kubo I, Muroi H, Kubo A. Antibacterial activity of a long-chain alcohols against *Streptococcus mutans*. *J Agric Food Chem*. 1993; (41): 2447-50.

Kunamoto CA. *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol*. 2002; 5(6): 608-11.

Kvaal C, Lachke SA, Srikantha T, Daniels K, McCoy J, Soll DR. Misexpression of the opaque-phase-specific gene PEP1 (SAP1) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. *Infect Immun*. 1999; (67): 6652-62.

Lewis, K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat Ver Drug Discov*. 2013; 12(5): 371-87.

Li L, Redding S, Dongari-Bagtzoglou A. *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. *J Dent Res*. 2007; (86): 204-15.

Lima MRF, Ximenes ECPA, Luna JS, Sant'Ana AEG. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. *Rev Bras of Pharmacog*. 2006; 16(3): 300-06.

Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*. 1986; (50): 353-80.

Lohse MB, Johnson AD. Differential phagocytosis of white versus opaque *Candida albicans* by *Drosophila* and mouse phagocytes. *PLoS One*. 2008; 3(1): 473.

Lourenço MV. Biotecnologia de plantas medicinais: produção de biomoléculas. *Biológico*. 2003; 65(1): 63-5.

Lynch DP. Oral candidiasis: history, classification and clinical presentation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994; (78): 189-93.

Mahajan JR, Monteiro MB. New diterpenoids from *Pterodon emarginatus* Vog. *J Chem Soc-Perkin Trans*. 1973; (1): 520-25.

Martchenko M, Alarco AM, Harcus D, Whiteway M. Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene. *Mol Biol Cell*. 2004; (15): 456-67.

Mascaro UCP, Teixeira DF, Gilbert B. Avaliação da sustentabilidade da coleta de frutos de “sucupira branca” (*Pterodon emarginatus* Vog.) após queda espontânea. *Rev Bras de PI Med.* 2004; 7(1): 23-5.

McCourtie J, Douglas LJ. Relationship between cell surface composition of *Candida albicans* and adherence to acrylic after growth on different carbon sources. *Infect Immun.* 1981; 32(3): 1234-41.

McGaw LJ, Lall N, Meyer JJM, Eloff JN. “The potential of South African plants against *Mycobacterium* infections. *J of Ethnopharmacol.* 2008; 119(3): 482-500.

Menna-Barreto RFS, Laranja GAT, Silva MCC, Coelho MGP, Paes MC, Oliveira MM *et al.* Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of *Pterodon pubescens* seed oil: geranylgeraniol as the major bioactive component. *Parasitol Res.* 2008; 103(1): 7-117

Michilis E. Diagnóstico situacional dos serviços de fitoterapia no Estado do Rio de Janeiro. *Rev Bras Farmacogn.* 2004; 14(1): 16-9.

Miranda MLD; Garceza FR; Aboitb AR; Garceza WS. Sesquiterpenos e outros constituintes das folhas de *Pterodon pubescens* Benth (Leguminosae). *Quim Nova.* 2013; XX(0): 1-4.

Monroe D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biol.* 2007; (5): 307.

Moraes SM, Dantas JDP, Silva ARA, Magalhães EF. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. *Rev Bras Farmacogn.* 2005; (15): 169-77.

Mors WB, Dos Santos MF, Monteiro HB. Chemoprophylactic agent in Schistosomiasis: 14, 15-epoxygeranylgeraniol. *Science.* 1967; 157(3791): 950-51.

Mowat E, Williams C, Jones B, McChlery S, Ramage G. The characteristics of *Aspergillus fumigatus* mycetoma development: is this a biofilm? *Med Mycol.* 2009; 47(1): 120-26.

Mühlschlegel FA, Fonzi WA. PHR2 of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene PHR1 with an inverted pattern of pH-dependent expression. *Mol Cell Biol.* 1997; 17(10): 5960-67.

Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003; (67): 400-28.

Napimoga MH, Kamiya RU, Rosa RT, Rosa EAR, Höfling JF, Mattos-Graner RO *et al.* Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active individuals. *J Med Microbiol.* 2004; (53): 697-703.

Navarre WW, Schneewind O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell envelope. *Microbiol Mol Rev.* 1999; (63): 174-29.

Ndamba J, Lemmich E, Molgaard P. Investigation of the diurnal, ontogenetic and seasonal variation in the molluscicidal saponin content of *Phytolacca dodecandra* aqueous berry extracts. *Phytochem.* 1994; 35(1): 95-9.

Neil AR, Gow, Hube B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Curr Opin Microbiol.* 2012; 15(4): 406-12.

Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Massey R, Holoyda K, Hoff B *et al.* Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; (51): 510-20.

Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2009, 73(3): 407-50.

Nomura R, Nakano T, Ooshima T. Contribution of glucan-binding protein C of *Streptococcus mutans* to bacteremia occurrence. *Arc of Oral Biol.* 2004; (49): 783-88.

Nunan EA, Carvalho MG, Piloveloso D. Furanoditerpenes with antiinflammatory and pro-inflammatory activity. *Braz J Med Biol Res.* 1982; 15(6): 450.

Odds FC. *Candida and candidosis a review and bibliography.* 2 ed. Bailliere Tindal, London: United Kingdom; 1988. p. 468.

Odds FC. Pathogenic fungi in the 21st century. *Trends Microbiol.* 2000; 8(5): 200-01.

Ogawa A, Furukawa S, Fujita S, Mitobe J, Kawarai T, Narisawa N *et al.* Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation by *Streptococcus salivarius* FruA. *Appl Environ Microbiol.* 2011; (77): 1572-80.

Parveen M, Hasan MK, Takahashi J, Murata Y, Kitagawa E, Kodama O *et al.* Response of *Saccharomyces cerevisiae* to a monoterpene: evaluation of antifungal potential by DNA microarray analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2004; (54): 46-5.

Paula JAM, Ferri PH, Bara MTF, Tresvenzol LMF, Sá FAS, Paula JR. Intraspecific chemical variability in the essential oils of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum (Myrtaceae). *Bioch Syst Ecol.* 2011; (39): 643-50.

Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W, Ten Cate JM. Development of candida-associated denture stomatitis: new insights. *J Appl Oral Sci.* 2008; 16(2): 86-94.

Perlin DS. Antifungal drug resistance: do molecular methods provide a way forward? *Curr Opin Infect Dis.* 2009; 22: 568-73.

Perlroth J, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol.* 2007; (45): 321-46.

Pfaller MA, Messer SA, Gee S, Joly S, Pujol C, Sullivan DJ *et al.* In vitro susceptibilities of *Candida dubliniensis* isolates tested against the new triazole and echinocandin antifungal agents. *J Clin Microbiol.* 1999; (37): 840-72.

Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ *et al.* Caspofungin activity against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida*. *J of Clinical Microbiol.* 2003: 5729-31.

Pfaller MA, Messer SA, Moet GJ, Jones RN, Castanheira M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the Sentry Antimicrobial Surveillance Program. *Int J Antimicrob Agents.* 2012; (38): 65-9.



Phan QT, Fratti RA, Prasadarao NV, Edwards JE Jr, Filler SG. N-cadherin mediates endocytosis of *Candida albicans* by endothelial cells. *J Biol Chem*. 2005; (280): 10455-61.

Phan QT, Myers CL, Fu Y, Sheppard DC, Yeaman MR, Welch WH *et al.*. Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS Bio*. 2007; 5(3): 64.

Pimenta ATA, Santiago GMP, Arriaga AMC, Menezes GHA, Bezerra SB. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade larvicida de *Pterodon polygalaeflorus* Benth (Leguminosae) sobre *Aedes aegypti*. *Rev Bras Farmacogn*. 2006; 16(4): 501-05.

Potterat O, Hamburger M. Drug discovery and development with plantderived compounds. *Prog Drug Res*. 2008; 65: 45-18.

Ramage G, Walle KV, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; (45): 2475-79.

Rates SMK. Plants as source of drugs. *Toxicon*. 2001; (39): 603-13.

Román E, Arana DM, Nombela C, Alonso-Monge R, Pia J. MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence. *Trends Microbiol*. 2007; 15(4):181-90.

Rossignol T, Ding C, Guida A, d'Enfert C, Higgins DG, Butler G. Correlation between biofilm formation and the hypoxic response in *Candida parapsilosis*. *Eukaryot Cell*. 2009, (8): 550-59.

Ruhnke M, Eigler A, Tennagen I, Geiseler B, Engelmann E, Trautmann M. Emergence of fluconazole-resistant strains of *Candida albicans* in patients with recurrent oropharyngeal candidosis and human immunodeficiency virus infection. *J Clin Microbiol*. 1994; 32(9): 2092-98.

Ruhnke M, Schmidt-Westhausen A, Morschhauser J. Development of resistance to fluconazole in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in a patient with AIDS. *J Antimicrobiol Chemother*. 2000; 46(2): 291-95.

Ruhnke M. Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida albicans* yeasts. *Curr Drug Targets*. 2006; 7(4): 495-504.

Sabino KCC, Gayer CRM, Vaz LCA, Santos LRL, Felzeszwalb I, Coelho MGP. In vitro and in vivo Toxicological Studies of the *Pterodon pubescens* Seed oil. *Toxicol Lett.* 1999; (108): 27-35.

Salminen JP, Ossipov V, Haukioja E, Pihlaja K. Seasonal variation in the content of hydrolysable tannins in leaves of *Betula pubescens*. *Phytochem.* 2001; 57(1): 15-22.

Samaranayake LP, Leung WK, Jin L. Oral mucosal fungal infections. *Periodontol.* 2009; (49): 39-59.

Samaranayake LP. Fungi of relevance to dentistry. *Essential microbiology for dentistry.* 4. ed. London: Churchill Livingstone; 2002. p. 142-7.

Santos Filho D, Vichnewski W, Baker PM, Gilbert B. Prophylaxis of Schistosomiasis. diterpenes from *Pterodon pubescens*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* 1972; 44(1): 45-9.

Santos AP, Zatta DT, Moraes WF, Bara MTF, Ferri PH, Silva MRR *et al.* Composição química, atividade antimicrobiana do óleo essencial e ocorrência de esteróides nas folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae. *Braz J of Pharmacogn.* 2010; 20(6): 891-96.

Saville SP, Lazzell AL, Monteagudo C, Lopez-Ribot JL. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell.* 2003; (2): 1053-60.

Schwob I, Bessiere JM, Masotti V, Viano J. Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle. *Biochem Syst Ecol.* 2004; 32(8): 735-45.

Seider K, Heyken A, Luttich A, Miramon P, Hube B. Interaction of pathogenic yeasts with phagocytes: survival, persistence and escape. *Curr Opin Microbiol.* 2010; 13(4): 392-400.

Servat L, Spindola HM, Rodrigues RAF, Sousa IMO, Ruiz ALTG, Carvalho JE *et al.* *Pterodon pubescens* Benth: stability study of microencapsulated extract and isolated compounds monitored by antinociceptive assays. *J Braz Chem Soc.* 2012; 23(7): 1244-53.

Shu YZ. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. *J Nat Prod.* 1998; (61): 1053-71.

Silva MCC, Gayer CRM, Lopes CS, Calixto NO, Reis PA, Passaes CPB *et al.* Acute and topic antiedematogenic fractions isolated from the seeds of *Pterodon pubescens*. *J Pharm and Pharmacol.* 2004; (55): 135-41.

Silva N. Understanding biofilms dare we getting closer? *Lancet Infect Dis.* 2009; 9: 216.

Silverman RJ, Nobbs AH, Vickerman MM, Barbour ME, Jenkinson HF. Interaction of *Candida albicans* cell wall Als3 protein with *Streptococcus gordonii* SspB adhesin promotes development of mixed-species communities. *Infect and Immun.* 2010; 78(11): 4644-52.

Slots J. Update of general health risk of periodontal disease. *Int Dent J.* 2003; 53(3): 200-7.

Slutsky B, Staebell M, Anderson J, Risen L, Pfaller M, Sol DR. “White opaque transition”: a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol.* 1987; (169): 189-97.

Smith A, Macfarlane WT. Fungi and other opportunistic pathogens in plaque. In: Newman H N, Wilson M. *Dental plaque revisited* bioline. Cardiff University of Wales. 1999. p. 387-18.

Smith AJ, Jackson MS, Bagg J. The ecology of *Staphylococcus* species in oral cavity. *J Med Microbiol.* 2001; (50): 940-46.

Souto R, Andrade AFB, Uzeda M, Colombo APV. Prevalence of “non-oral” pathogenic bacteria in subgingival biofilm of subjects with chronic periodontitis. *Braz J of Microbiol.* 2006; (37): 208-15.

Spellberg BJ, Ibrahim AS, Avanesian V, Fu Y, Myers C, Phan QT *et al.* Efficacy of the anti-*Candida* rAls3p-N or rAls1p-N vaccines against disseminated and mucosal candidiasis. *J Infect Dis.* 2006; (194): 256-60.

Spindola HM, Carvalho JE, Ruiz ALTG, Rodrigues RAF, Denny C, Sousa IMO *et al.* Furanoditerpenes from *Pterodon pubescens* Benth with selective in vitro anticancer activity for prostate cell line. *J Braz Chem Soc.* 2009; 20(3): 569-75.

Spindola HM, Servat L, Denny C, Rodrigues RAF, Eberlin MN, Cabral E *et al.* Antinociceptive effect of geranylgeraniol and 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroxyvouacapan-17 $\beta$ -oate methyl ester isolated from *Pterodon pubescens* Benth. *BMC Pharmacol.* 2010; 1(10):1-10. doi:10.1186/1471-2210-10-1.

Sudbery PE. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol.* 2011; (9): 737-48.

Stehr F, Felk A, Kretschmar M, Schaller M, Schäfer W, Hube B. Extracellular hydrolytic enzymes and their relevance during *Candida albicans* infections. *Myc.* 2000; 43(2): 17-21.

Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 2002, (56): 187-209.

Suárez GR, Engleman EM. Depósito de taninos en la testa de *Amaranthus hypochondriacus* L. (alegría). *Agrociência.* 1980; (42): 35-50.

Sutak R, Lesuisse E, Tachezy J, Richardson DR. Crusade for iron: iron uptake in unicellular eukaryotes and its significance for virulence. *Trends Microbiol.* 2008; 16(6): 261-68.

Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. The microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent Educ* 2001; (65): 1028-37.

Teng LJ, Hsueh PR, Chen YC, Ho SW, Luh KT. Antimicrobial susceptibility of viridans group streptococci in Taiwan with an emphasis on the high rates of resistance to penicillin and macrolides in *Streptococcus oralis*. *J Antimicrobial Chemoth.* 1998; (41): 621-27.

Torrenegra R, Bauereib P, Achenbach H. Homoormosanine type alkaloids from *Bowdichia virgiloides*. *Phytochemistry.* 1989; (28): 2219-21.

Tôrres AR, Oliveira RAG, Diniz MFFM, Araújo EC. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. *Rev Bras Farmacogn.* 2005; (15): 373-80.

Tsuda H, Yamashita Y, Shibata Y, Nakano Y, Koga T. Genes involved in bacitracin resistance in *Streptococcus mutans*. *Antimicrob Agents and Chemother.* 2002; 46(12): 3756-64.

Turi M, Turi E, Koljalg S, Mikelsaar M. Influence of aqueous extracts of medicinal plants on surface hydrophobicity of *Escherichia coli* strains of different origin. *APMIS.* 1997; (105): 956-62.

Vanden-Bosche H, Marichal P, Odds FC. Molecular mechanisms of drug resistance in fungi. *Trends Microbiol.* 1994; (2): 393-400.

Vendruscolo GS, Rates SMK, Mentz LA. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Rev Bras Farmacogn.* 2005; (15): 361-72.

Vik A, James A, Gundersen LL. Screening of terpenos and derivatives for antimycobacterial activity; Identification of geranylgeraniol and geranylgeranyl acetate as potent inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. *Plant Med.* 2007; (76): 1410-12.

Vranakis I, Goniou I, Psaroulakia A, Sandalakis V, Tselentis Y, Gevaert K *et al.* Proteome studies of bacterial antibiotic resistance mechanisms. *J of Prot XX.* 2013: 1-12. [dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.10.027](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.10.027)

Wächtler B, Wilson D, Haedicke K, Dalle F, Hube B. From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. *PLoS One.* 2011, 6(2):17046. doi: 10.1371/journal.pone.0017046.

Wächtler B, Citiulo F, Jablonowski N, Förster S, Dalle F, Schaller M *et al.* *Candida albicans*-epithelial interactions: dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process. *PLoS One.* 2012; 7(5): 36952. doi: 10.1371/journal.pone.0036952.

Waterman PG, Mole S. Analysis of phenolic plant metabolites, 1 ed. Blackwell Scientific Publications: Oxford; 1994. 272 p.

Weems JJ. *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clin Infect Dis*. 1992; (14): 756-66.

Weig M, Jansch L, Gross U, De Koster CG, Klis FM, De Groot PW. Systematic identification in silico of covalently bound cell wall proteins and analysis of protein-polysaccharide linkages of the human pathogen *Candida glabrata*. *Microbiol*. 2004; 150(10): 3129-44.

Weissman Z, Kornitzer D. A family of *Candida* cell surface haem-binding proteins involved in haemin and haemoglobin-iron utilization. *Mol Microbiol*. 2004; (53): 1209-20.

Wenzel RP. Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality. *Clin Infect Dis*. 1995; (20): 1531-34.

Wilson M. Bacterial biofilms and human disease. *Science Progress*. 2001; (84): 235-54.

Wysong DR, Christin L, Sugar AM, Robbins PW, Diamond RD. Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infect Immun*. 1998; (66): 1953-61.

York T, Wet H, Van Vuuren SF. "Plants used for treating respiratory infections in rural Maputaland, KwaZulu- Natal, South Africa". *J of Ethnopharmacol*. 2011; 135(3): 696-710.

Zidorn C, Stuppner H. Evaluation of chemosystematic characters in the genus *Lentodon* (Asteraceae). *Taxon*. 2011; (50): 115-33.

Zordan R, Cormack B. Adhesins in opportunistic fungal pathogens. In *Candida and Candidiasis*, 2 ed. Calderone RA, Clancy CJ. ASM Press; 2012: 243-59.