

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CAMPUS DE ARARAQUARA

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA, CITOTOXICIDADE E ALVOS  
DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE *Melaleuca alternifolia* Cheel  
(MYRTACEAE) E DE *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (MYRTACEAE)

TATIANA MARIA DE SOUZA MOREIRA

ORIENTADORA: Profa. Dra. Rosemeire C. L. R. Pietro

ARARAQUARA - SP

2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CAMPUS DE ARARAQUARA

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA, CITOTOXICIDADE E ALVOS  
DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE *Melaleuca alternifolia* Cheel  
(MYRTACEAE) E DE *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (MYRTACEAE)

TATIANA MARIA DE SOUZA MOREIRA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

ARARAQUARA - SP

2010

### **Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

M838e            Moreira, Tatiana Maria de Souza  
                    Estudo da composição química, citotoxicidade e alvos da atividade  
antifúngica de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) e de *Plinia  
cauliflora* (Mart.) Kausel (MYRTACEAE) . / Tatiana Maria de Souza  
Moreira. – Araraquara, 2010.  
                    153 f. + anexo

                    Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita  
Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação  
em Ciências Farmacêuticas

                    Orientador: Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

                    1.Candida spp. 2. Casuarinina. 3. Myrtaceae. 4. Farmacognosia. 5.  
Microbiologia. I. Pietro, Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues, orient. II.  
Título.

**CAPES: 40300005**

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro e sempre, agradeço a Deus, Nossa Senhora e ao meu anjo da guarda por cuidarem de cada detalhe do meu caminho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro por ter incentivado minha curiosidade científica que se transformou em projetos, auxílios e na conquista de um Doutorado.

Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas, Laboratório de Química Orgânica, do pelo total apoio aos estudos fitoquímicos.

À Dr Carol Munro e Professor Dr Neil Gow pelo trabalho em colaboração no “Institute of Medical Sciences”, “University of Aberdeen”, Escócia.

A todo o laboratório do “Aberdeen Fungal Group” pelo auxílio constante durante minha estadia com eles.

Às Professoras Dra. Raquel Regina Duarte Moreira e Dra. Taís Maria Bauab e aos funcionários Sílvia e Luís Eduardo por toda paciência, abrigo, auxílio e préstimo para que a pesquisa não parasse durante a reforma do Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica.

Aos Professores Dr. Clesley Fernando Zanelli e Dr. Sandro Roberto Valentini e seus alunos por cederem o Laboratório de Biologia Molecular e auxiliarem na realização de muitos experimentos.

À Profa. Dra. Eliana Varanda por ceder o Laboratório de Cultura Celular.

Aos Professores Dra. Elisabeth Pisolito, Dr. João Aristeu da Rosa e Dr. Mário Cilense e seus alunos pela realização dos ensaios de microscopia eletrônica de varredura.

À Profa. Dra. Mary Rosa e seu aluno Guilherme pelas análises de CG-EM.

À Profa. Dra. Vera Lucia Borges Isaac e ao Prof. Dr. Luiz Victor Silva do Sacramento pelo companheirismo e pela ajuda em tantos experimentos.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Fátima, Angélica e Osmar.

À Dra. e amiga Juliana Severi, sem quem eu não teria conseguido realizar os estudos fitoquímicos.

Aos meus amigos de laboratório, Emerson, Warley, Flávio, Natália, Renata, Mayara, Lara, Carol, Henrique e às demais estagiárias, cuja companhia foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu pai e à Angélica (Tatoo) por terem me acompanhado de um lugar muito especial.

À minha família e ao novo integrante dela pelo suporte, paciência, todos os tipos de auxílio e, acima de tudo, amor incondicional.

À Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

À seção de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

A todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

À FAPESP, pela bolsa concedida.

*“... é melhor, muito melhor, contentar-se com a realidade; se ela não é tão brilhante como os sonhos, tem pelo menos a vantagem de existir.”*

*(Machado de Assis. A mão e a luva.)*

## RESUMO

O gênero *Candida* é causa frequente de infecção da mucosa oral e vaginal, sendo motivo de preocupação na área de saúde devido à reincidência das infecções, crescimento de infecções sistêmicas, resistência de diversas cepas e toxicidade dos antifúngicos. Plantas medicinais são usadas popularmente no tratamento de candidíases e por este motivo, busca-se, além de avaliar a composição fitoquímica do óleo de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae) e do extrato de *Plinia cauliflora* (Myrtaceae), verificar o mecanismo de ação destas amostras sobre diferentes espécies de *Candida*. A constituição do óleo essencial de *M. alternifolia* está descrita na literatura e por cromatografia gasosa identificou-se a presença de substâncias importantes da sua composição na amostra utilizada. Foi traçado o perfil cromatográfico do extrato das folhas e das frações de *P. cauliflora* para conhecer sua constituição. Foram isoladas duas miricetinas e duas quercetinas glicosiladas e o elagitanino casuarinina. Na avaliação da atividade anti-*Candida*, o óleo essencial apresentou-se fungicida, com concentração citotóxica de 50% na mesma faixa. Entre as amostras avaliadas de *P. cauliflora*, o extrato, a fração butanólica e a fração enriquecida com o derivado elágico apresentaram a melhor atividade, foram fungistáticas e a concentração citotóxica foi maior que a concentração ativa. O óleo essencial mostrou-se inibidor da formação de hifas, reduziu a quantidade de ergosterol, sem se ligar a este composto e promoveu alterações significativas principalmente na parede celular da forma filamentosa. Por outro lado, as frações mais ativas de *P. cauliflora* inibiram o desenvolvimento de hifas, mas estimularam a síntese de ergosterol e indicaram ter mais de um alvo de ação, ligando-se ao ergosterol e agindo externamente por modificação do arranjo da parede celular das espécies de *Candida* sem alterar a sua composição. Desta forma, a atividade fungicida do óleo essencial de *M. alternifolia* deve-se principalmente à alteração da permeabilidade da membrana celular, observando-se inibição da formação de hifas e do desenvolvimento das estruturas de parede. A fração de *P. cauliflora* composta de casuarinina é fungistática, ligando-se ao ergosterol e promovendo alterações da parede celular.

**Palavras-chave:** *Candida* spp, casuarinina, mecanismo de ação, Myrtaceae, óleo essencial.



## ABSTRACT

*Candida* genus is often the reason of oral and vaginal mucosal infections and it is cause of concern in the health area due to the relapsing of infections, rising in the number of systemic infections, resistance of several strains and high toxicity of synthesized antifungal agents. Medicinal plants have been used in the treatment of candidiasis, and this is the reason to evaluate the phytochemical composition of essential oil from *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae) and extract of *Plinia cauliflora* (Myrtaceae) in order to verify their mechanism of action against different species of *Candida*. The constitution of the essential oil is already described in the literature and it was possible to confirm the compounds by gas chromatography in the sample utilized. It was studied the fingerprint of the extract of *P. cauliflora* leaves and fraction applying chromatographic techniques. It was isolated two glucosilated myricetin and quercetin and the ellagitannin casuarinin. The essential oil showed fungicidal activity against *Candida* with 50% of cytotoxicity in the same concentration rate of the activity. Among samples of *P. cauliflora*, extract, butanolic fraction and the riched fraction with the ellagic acid derivate showed the better activity but it was fungistatic. The cytotoxic concentration was higher than the concentration of action. The essential oil showed to inhibit hyphae formation, to reduced the amount of ergosterol without binding to it and there were significative changes mainly in the hyphal cell wall. The more active fractions of *P. cauliflora* inhibited hiphae development, stimulated ergosterol synthesis and indicated to have more than just one target since they bound directly to ergosterol and showed to act externally by changing cell wall assemble without changes in the composition. Thus, the fungicidal activity of *M. alternifolia* essential oil is mainly due to changes in cellular membrane permeability as described in literature meanwhile the ellagitannin fractions of *P. cauliflora* are fungistatic, they bound to ergosterol and showed to change the cell wall.

**Keywords:** *Candida* spp, casuarinin, mechanism of action, Myrtaceae, essential oil.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Polissacarídeos constituintes da parede celular de leveduras .....	19
Figura 2: Moléculas e enzimas importantes da rota biossintética de ergosterol .....	21
Figura 3: Ilustração da constituição da parede e membrana celular de <i>C. albicans</i> .....	21
Figura 4: Esquema dos principais alvos de antifúngicos em leveduras .....	24
Figura 5: Fotografias de <i>M. alternifolia</i> .....	28
Figura 6: Exemplos das moléculas presentes no óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> .....	31
Figura 7: Fotografias de <i>P. cauliflora</i> .....	35
Figura 8: Esquemas dos estudos químicos realizados com as folhas de <i>P. cauliflora</i> ...	55
Figura 9: Esquema de diluição seriada em microplaca para o extrato e as frações de <i>P. cauliflora</i> .....	60
Figura 10: Cromatograma do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> .....	73
Figura 11: Perfil cromatográfico do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> por CG-EM .....	75
Figura 12: Reações histoquímicas .....	78
Figura 13: Cromatograma do extrato e frações obtidas das folhas de <i>P. cauliflora</i> .....	79
Figura 14: Teores de fenóis, taninos e flavonóides totais das amostras de <i>P. cauliflora</i> .....	81
Figura 15: Perfil cromatográfico e espectros de UV .....	82
Figura 16: Cromatograma das subfrações da FrAcOEt.....	83
Figura 17: Flavonóides isolados e identificados da FrAcOEt.....	85
Figura 18: Cromatograma das sub-frações da FrBuOH (1-152), da FrBuOH do extrato EtOH 70 das folhas de <i>P. cauliflora</i> e rutina .....	85
Figura 19: Cromatograma de purificação de subFr #49-52 da FrBuOH do extrato EtOH 70 das folhas de <i>P. cauliflora</i> .....	86
Figura 20: Estrutura do elagitanino casuarinina .....	87
Figura 21: Esquema dos resultados fitoquímicos obtidos sobre a constituição das folhas de <i>P. cauliflora</i> .....	88
Figura 22: Curva de crescimento de <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. tropicalis</i> sem tratamento e tratadas com o óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> , FrBuOH do extrato de <i>P. cauliflora</i> e fluconazol.....	93

Figura 23: Curva de citotoxicidade das amostras vegetais em diferentes concentrações .....	95
Figura 24: Porcentagem de formação de levedura, tubo germinativo pseudo-hifa e hifa em <i>C. tropicalis</i> sob diferentes tratamentos .....	96
Figura 25: Comprimento, em $\mu\text{m}$ , do filamento da hifa de <i>C. albicans</i> SC5314 controle e tratada com as amostras vegetais .....	97
Figura 26: Células hifais de <i>C. albicans</i> SC5314 coradas com Calcofluor White .....	98
Figura 27: Espectros de ergosterol .....	101
Figura 28: Microscopia eletrônica de varredura das leveduras tratadas e não tratadas .....	104
Figura 29: Microscopia eletrônica de transmissão das células de <i>C. albicans</i> SC5314. ....	105
Figura 30: Quantificação dos monômeros de quitina (glicosamina), $\beta$ -glucana (glicose) e manana (manose) para as células de <i>C. albicans</i> SC5314 tratadas com as amostras vegetais.....	106
Figura 31: Comparação de quitina (glicosamina), $\beta$ -glucana (glicose) e manana (manose) entre as células hifais sem tratamento, tratadas com óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> a 0,12% e a 0,03% com as células leveduriformes sem tratamento (controle) .....	107
Figura 32: Quantificação das proteínas da parede celular de <i>C. albicans</i> SC5314.....	108
Figura 33: Porosidade relativa da parede celular de <i>C. albicans</i> SC5314 comparando controle e diferentes tratamentos .....	109

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais componentes do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> .....	31
Tabela 2: Gradientes de eluição utilizados para determinação do perfil cromatográfico do extrato EtOH 70 das folhas de <i>P. cauliflora</i> . ....	51
Tabela 3: Proporção dos solventes utilizados na otimização do sistema solvente para HSCCC de FrBuOH.....	53
Tabela 4: Faixa de concentração das amostras para a avaliação da atividade antimicrobiana. ....	57
Tabela 5: Faixa de concentração das amostras para a avaliação da citotoxicidade. ....	62
Tabela 6: Concentração das amostras vegetais e antifúngico para o ensaio de quantificação de ergosterol. ....	65
Tabela 7: Concentração das amostras vegetais incubadas com as espécies de <i>Candida</i> para o ensaio com Calcofluor White.....	67
Tabela 8: Substâncias identificadas no óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> por CG-EM. ..	76
Tabela 9: Rendimento do extrato seco das folhas de <i>P.cauliflora</i> e das frações.....	79
Tabela 10: Agrupamento resultante do fracionamento da FrAq.....	87
Tabela 11: Valores dos halos de inibição frente às espécies de <i>Candida</i> .....	89
Tabela 12: Valores de CIM e CFM das amostras vegetais. ....	90
Tabela 13: Valores de CIM das amostras vegetais contra <i>C. albicans</i> cepa de referência e cepa de isolado clínico.....	87
Tabela 14: Faixa de concentração que promove redução de 50% (CC50) de viabilidade celular para células SIRC. ....	94
Tabela 15: Valores de CIM para as amostras vegetais ativas com adição de ergosterol exógeno. ....	99
Tabela 16: Inibição da biossíntese de ergosterol.....	100
Tabela 17: Valores de CIM para as amostras vegetais ativas com adição de sorbitol. ....	102

## **ABREVIATURAS**

24(28)DHE: 24(28) dihidroergosterol

ACN: acetonitrila

ANOVA: análise de variância

ATCC: "American Type Culture Collection"

CC: Cromatografia em Coluna

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CFM: Concentração Fungicida Mínima

CG-EM: Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CLSI: "Clinical and Laboratory Standards Institute"

DEAE: dietilaminoetilcelulose

DMSO: dimetilsulfóxido

DO: densidade óptica

DMSO-*d*<sub>6</sub>: dimetilsulfóxido deuterado

EDTA: ácido etilenodiamino tetracético

ESI-MS: Espectrometria de massas com ionização por eletrospray

EtOH 70: extrato etanol 70%

FrAcOEt: Fração acetato de etila

FrAq: Fração aquosa

FrBuOH: Fração butanólica

Hex: hexano

HPLC-UV-DAD: "High Performance Liquid Chromatography Diode Array Detection"

HSCCC: "High Speed Counter-Current Chromatography"

MeOH: metanol

MOPS: ácido 3-[N-morfino] propanosulfônico

MPLC: "Medium Speed Counter-Current Chromatography"

Myr-*alose*: miricetina-3-*O*- $\beta$ -alopiranosídeo

Myr-*galactose*: miricetina-3-*O*- $\beta$ -galactopiranosídeo

NCCLS: "National Committee for Clinical Laboratory Standards"

PBS: "Phosphate Buffered Saline"

PMSF: "phenylmethylsulfonyl fluoride"

Rf: fator de retenção

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

SDS: "sodium dodecyl sulphate"

SIRC: "Statens Seruminstitut Rabbit Cornea"

subFr: sub-fração

TOCSY: "Total Correlation Spectroscopy"

TFA: ácido trifluoracético

YPD: "yeast extract, peptone and dextrose medium"

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	17
1.1.1. O gênero <i>Candida</i> .....	17
1.1.2. Alvos da atividade antifúngica.....	19
1.1.3. Plantas com atividade antifúngica .....	25
1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	27
1.2.1. <i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel (Myrtaceae).....	28
1.2.2. <i>Plinia cauliflora</i> (Mart.) Kausel (Myrtaceae).....	34
2. OBJETIVO .....	37
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	38
3.1. MATERIAL.....	38
3.1.1. Solventes, reagentes e meios de cultura .....	38
3.1.2. Equipamentos.....	40
3.1.3. Material vegetal.....	44
3.1.4. Micro-organismos.....	44
3.1.5. Célula de mamífero .....	44
3.2. MÉTODOS .....	45
3.2.1. Análises fitoquímicas .....	45
3.2.1.1. Óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> .....	45
Perfil cromatográfico do óleo essencial por cromatografia em camada delgada.....	45
Perfil cromatográfico do óleo essencial por cromatografia gasosa .....	45
3.2.1.2. Folhas de <i>P. cauliflora</i> .....	45
Histoquímica das folhas .....	45
Obtenção do extrato e das frações .....	47
Análise quantitativa .....	48
Determinação do teor de fenóis totais .....	48
Determinação do teor de taninos totais.....	49
Determinação do teor de flavonóides totais .....	49
Perfil cromatográfico do extrato de folhas de <i>P. cauliflora</i> .....	50
Purificação do extrato de <i>P. cauliflora</i> .....	51

Cromatografia em coluna.....	51
Cromatografia em contra-corrente de alta velocidade.....	52
Cromatografia líquida de média eficiência.....	54
3.2.2. Avaliação da atividade antifúngica .....	55
Preparo dos antifúngicos.....	55
Preparo das amostras.....	56
Preparo da suspensão de levedura .....	58
Teste de difusão em ágar .....	58
Determinação da concentração inibitória mínima e da concentração fungicida mínima .....	59
3.2.3. Efeitos sobre a curva de morte.....	61
3.2.4. Avaliação da citotoxicidade .....	61
Preparo das amostras.....	61
Procedimento .....	62
3.2.5. Efeitos sobre a morfologia .....	63
3.2.6. Efeitos sobre ergosterol.....	64
Ligação a ergosterol exógeno.....	64
Quantificação do ergosterol .....	65
3.2.7. Efeitos sobre a parede celular .....	66
Efeito de proteção do sorbitol.....	66
Microscopia de fluorescência.....	67
Microscopia eletrônica de varredura .....	68
Microscopia eletrônica de transmissão.....	69
Quantificação dos açúcares da parede celular .....	69
Extração da parede celular .....	69
Hidrólise dos polímeros de açúcares.....	70
Quantificação das proteínas de parede celular .....	71
Análise de porosidade da parede celular.....	71
3.2.8. Análise estatística.....	72
4. RESULTADOS.....	73
4.1. Análise fitoquímica.....	73



4.1.1. Óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> .....	73
Perfil cromatográfico do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> por CCD .....	73
Perfil cromatográfico do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> por CG-EM.....	73
4.1.2. Folhas de <i>P. cauliflora</i> .....	77
Histoquímica das folhas de <i>P. cauliflora</i> .....	77
Obtenção do extrato e das frações .....	79
Análise quantitativa .....	80
Determinação do teor de fenóis totais .....	80
Determinação do teor de taninos totais.....	80
Determinação do teor de flavonóides totais .....	80
Perfil cromatográfico do extrato de folhas de <i>P. cauliflora</i> .....	81
Purificação do extrato de <i>P. cauliflora</i> .....	83
Cromatografia em coluna .....	83
Cromatografia em contra-corrente de alta velocidade.....	85
Cromatografia líquida de média eficiência.....	87
4.2. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	89
Teste de difusão em ágar .....	89
Determinação da concentração inibitória mínima e da concentração fungicida mínima .....	89
4.3. Efeitos sobre a curva de morte.....	92
4.4. Avaliação da citotoxicidade .....	94
4.5. Alteração morfológica.....	96
4.6. Efeitos sobre ergosterol.....	98
Ligação a ergosterol exógeno.....	98
Quantificação de ergosterol.....	100
4.6. Efeitos sobre a parede .....	102
Efeito protetor do sorbitol .....	102
Microscopia de fluorescência.....	103
Microscopia eletrônica de varredura .....	103
Microscopia eletrônica de transmissão.....	105
Quantificação dos açúcares da parede celular .....	105

Quantificação das proteínas de parede celular .....	107
Análise de porosidade da parede celular .....	108
5. DISCUSSÃO .....	110
6. CONCLUSÃO .....	123
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	125

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1.1. O gênero *Candida*

O gênero *Candida* pertence à classe de fungos Deuteromicetos devido à falta de ciclo sexual conhecido (teleomorfismo). Tem como características comuns a produção de leveduras esféricas a ovóides (blastóporos) com a habilidade de formar pseudo-hifas. As espécies deste gênero são usualmente classificadas e identificadas por características morfológicas e propriedades bioquímicas específicas, como a produção de hifas verdadeiras e utilização de fontes únicas de carbono ou nitrogênio (MCCULLOUGH et al., 1996). Estudos de filogenética molecular colaboram com a classificação e identificação das espécies, já que características fenotípicas diferentes podem ser encontradas em cepas de uma mesma espécie (TSUI et al., 2008).

O termo fungo dimórfico é aplicado a muitas espécies do gênero *Candida* por apresentarem morfologia de levedura e de pseudo-hifa. *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* e *Candida tropicalis* possuem a capacidade de formação de hifas verdadeiras e, por isso, são chamadas de fungos polimórficos ou pleomórficos. Laboratorialmente, os blastoconídeos são formadas em temperaturas de 25 °C e pH baixo, enquanto que as hifas, longas e estreitas, são formadas a 35 °C, pH neutro a levemente alcalino e sob estímulo de soro. As pseudo-hifas desenvolvem-se em condições intermediárias, sendo que raramente formam hifas e vice-versa (BERMAN, 2006).

Muitas espécies de *Candida* são encontradas como habitantes inofensivas do trato gastrointestinal e genitourinário de pessoas saudáveis. Contudo, quando ocorre a quebra do equilíbrio que mantém essa relação comensal, estas espécies oportunistas causam infecções superficiais de mucosa (esofagiana, bucal e vaginal), de unha, dermatites e infecções sistêmicas, cuja gravidade é maior em pacientes debilitados e imunocomprometidos (BERMAN, 2006; ZAKIKHANY et al., 2007).

As infecções superficiais são mais comuns e *C. albicans* é a espécie patogênica de maior frequência. Geralmente, candidíases causadas por espécies não-*albicans* estão associadas a uma prévia colonização, imunossupressão e uso inadequado de

antibióticos (MORAN et al., 2002; GALLE e GIANINNI, 2004). Estudos apresentados pelos trabalhos de Galle e Gianinni (2004) e Holanda et al. (2007) relatam a prevalência de *C. albicans* (DAN et al., 2002; RIVERO et al., 2003; MARTENS et al., 2004; JACKSON et al., 2005) em casos de candidíases vulvo-vaginais (80-90%), seguidos pelo aumento de casos em que ocorre a presença de *Candida glabrata* (MARTENS et al., 2004; FERRAZZA et al., 2005; OZCAN et al., 2006), *C. tropicalis* (RIVERO et al., 2003; JACKSON et al., 2005; OZCAN et al., 2006), *C. krusei* (OZCAN et al., 2006) e *C. guilliermondii* (FERRAZZA et al., 2005).

Candidemia é o termo clínico utilizado para a infecção sistêmica por *Candida* (REES et al., 1998; MEDRANO et al., 2006). A crescente frequência de fungemia vem ocorrendo principalmente entre pacientes imunossuprimidos, recebendo antibióticos e expostos a procedimentos médicos invasivos (SAFDAR et al., 2002). Estudos brasileiros relatam que *C. albicans* também é a mais frequente espécie encontrada neste tipo de infecção (NGUYEN et al., 1996; BRILHANTE et al., 2005), sendo que as outras espécies são *Candida parapsilosis* (ELLIS et al., 2003) e *C. tropicalis* (COLOMBO et al., 1999; MARCHETTI et al., 2004).

A adesão é um tipo de interação com o hospedeiro que favorece a colonização e estabelecimento da infecção. *C. albicans* é considerada como a mais virulenta entre as espécies de *Candida* devido à sua forte aderência à superfície do hospedeiro, capacidade de produzir enzimas hidrolíticas e pleomorfismo. As interações físicas entre o fungo e as células epiteliais, endoteliais, matriz extracelular e materiais implantados no hospedeiro são mediadas por adesinas. Atividades enzimáticas queratinolíticas e colagenolíticas associam-se à invasão e colonização dos tecidos. Espécies não patogênicas, como *C. krusei* e *C. guilliermondii*, são menos aderentes e produzem menos proteinases que *C. albicans* e *C. tropicalis* (MCCULLOUGH et al., 1996; CHAFFIN et al., 1998). A interconversão da forma de levedura à de filamento está associada à capacidade de penetração dos tecidos, que é sustentada por análises histopatológicas de lesões demonstrando a proliferação dos filamentos (BERMAN, 2006; ZAKIKHANY et al., 2007).

### 1.1.2. Alvos da atividade antifúngica

De forma geral, nas células do gênero *Candida* existem compostos ausentes nas células de mamíferos que são excelentes alvos para os agentes antifúngicos. Estes compostos estão principalmente relacionados com a parede e a membrana celular da levedura (KLIS et al., 2001).

Cerca de 80% da parede celular é formado por polissacarídeos, com destaque para os polímeros ramificados de glicose com ligações do tipo  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6 ( $\beta$ -glucanas), os polímeros não-ramificados de *N*-acetil-*D*-glicosamina de ligações  $\beta$ -1,4 (quitina) e os polímeros de manose covalentemente associados a proteínas (mananoproteínas), como ilustrado pela Figura 1. O restante é composto por proteínas e, em menor quantidade, glicolídeos (CHAFFIN et al., 1998).

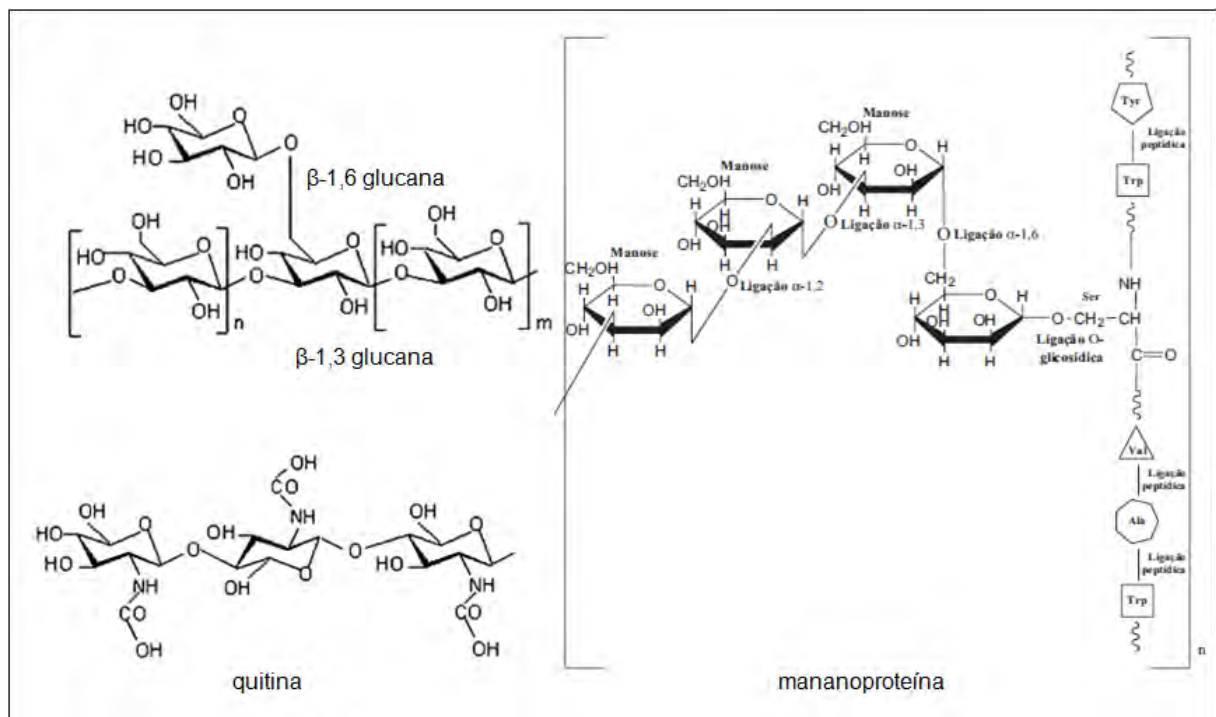


Figura 1: Polissacarídeos constituintes da parede celular de leveduras (FLEURI e SATO, 2005; RUIZ-HERRERA et al., 2006).

Os polímeros de quitina e de glucana são responsáveis pela resistência mecânica e formato das células fúngicas, estando mais próximos da membrana citoplasmática e fornecendo estrutura para a camada mais externa de proteínas que,

por sua vez, limita a permeabilidade e as propriedades hidrofóbicas da superfície celular, determina propriedades antigênicas e contém várias proteínas de adesão. A parede fúngica, assim, é formada por uma rede tridimensional elástica de ramificações de  $\beta$ -1,3-glucana ligadas a  $\beta$ -1,6-glucana e quitina por meio de suas terminações redutoras além de interações diretas entre estas duas últimas. Os polímeros de quitina podem formar intrincadas estruturas por meio de ligações de hidrogênio contribuindo com aumento da insolubilidade e estão particularmente presentes nas cicatrizes de brotamento e no anel em torno da constricção entre célula-mãe e broto (CHAFFIN et al., 1998; KLIS et al., 2001; CHAFFIN, 2008). O nível de quitina é cerca de 2 a 5 vezes maior na célula em formato de hifa do que na célula leveduriforme (MUNRO et al., 1998). Os polímeros de manose só existem na forma associada a proteínas, as mananoproteínas, que são os principais componentes da camada mais externa da parede, formando uma densa rede de fibrilas que por sua vez fazem o intermédio da aderência entre o fungo e a célula hospedeira (CHAFFIN et al., 1998; KLIS et al., 2001; CHAFFIN, 2008).

Entre as proteínas e mananoproteínas da parede celular existem duas classes de proteínas covalentemente ligadas à rede mais interna de polissacarídeos, de forma geral, ligadas a processos de formação e organização da parede e virulência. A classe mais abundante é a de proteínas ligadas a  $\beta$ -1,6-glucana por um fragmento de glicofosfatidilinositol (GPI) e a outra classe está ligada diretamente a  $\beta$ -1,3-glucana e são conhecidas como proteínas com repetições internas (Pir). Ainda existe uma terceira classe de proteínas não covalentemente ligadas aos polissacarídeos, muitas com atividade enzimática (CHAFFIN, 2008).

Na bicamada fosfolipoproteica da membrana está presente um esterol único aos fungos chamado ergosterol. A própria molécula de ergosterol, ou as enzimas utilizadas na sua rota biossintética (Figura 2) são importantes alvos para a ação de alguns antifúngicos (ONYEWU et al., 2003).

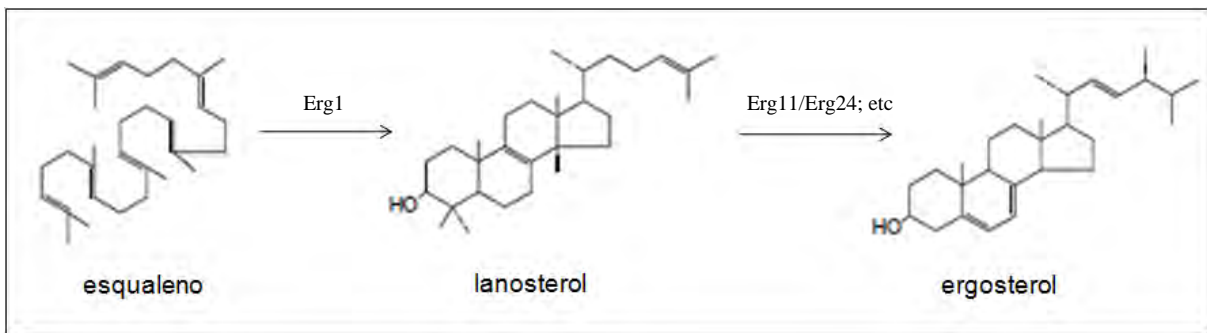


Figura 2: Moléculas e enzimas importantes da rota biossintética de ergosterol. Erg1= esqualeno epoxidase, Erg11= lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase e Erg24= esterol redutase.

A parede e a membrana celular de levedura podem, então, ser esquematizadas como apresentado na Figura 3.

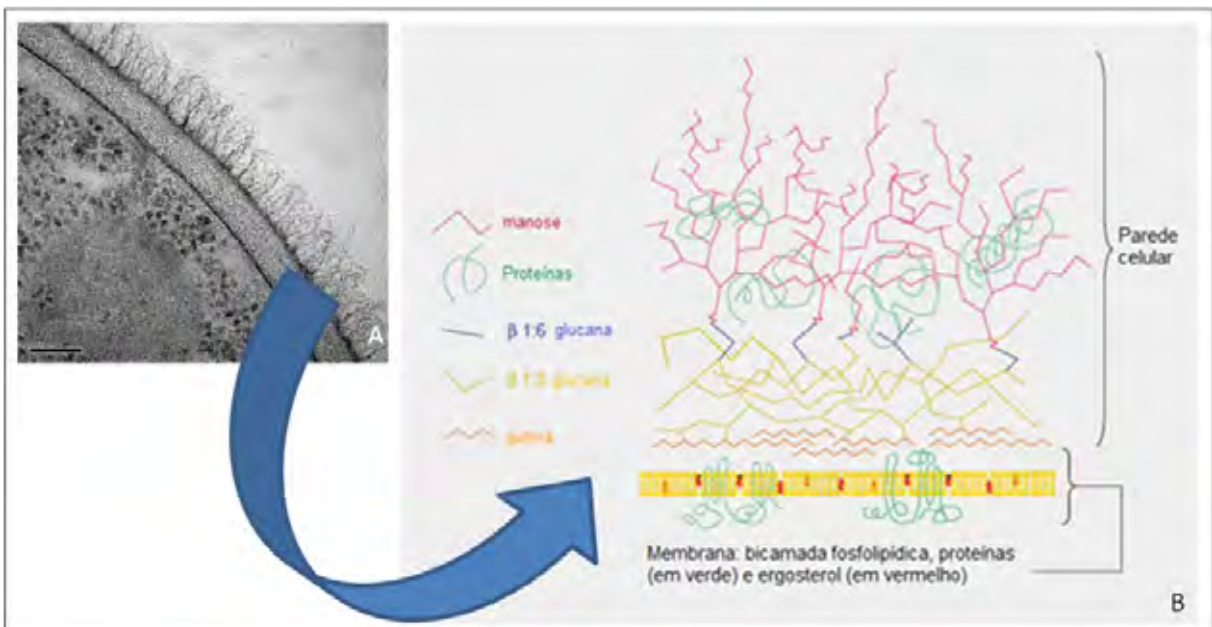


Figura 3: Ilustração da constituição da parede e membrana celular de *C. albicans*. A) Fotomicrografia eletrônica de transmissão da parede e membrana celular. B) Esquema da constituição de ambas (ODDS et al., 2003).

Os antifúngicos mais frequentemente utilizados na clínica pertencem a quatro classes de compostos: azóis (fluconazol, cetoconazol, itraconazol etc.), polienos (anfotericina B e nistatina), fluopirimidina (5-fluorocitosina) e alilaminas (terbinafina) (ODDS et al., 2003).

Os azóis são responsáveis por inibição do citocromo P450, principalmente da isoforma Cyp51p, enzima Erg11 da rota biossintética do ergosterol, envolvida na

desmetilação em 14 $\alpha$  do precursor lanosterol. Contudo, esta classe é fungistática e as células persistentes, principalmente em organismos imunossuprimidos, faz em uma seleção positiva dos mutantes resistentes. Sua toxicidade deve-se ao seu mecanismo de ação, sendo hepatotóxicos (ODDS et al., 2003; ONYEWU et al., 2003).

Os polienos ligam-se diretamente ao ergosterol presente na membrana dos fungos formando poros, o que altera a permeabilidade e tem consequente perda de componentes citoplasmáticos, levando à morte. O efeito fungicida também é atribuído a danos oxidativos causados na célula pelo polieno. Embora tenha maior afinidade pelo ergosterol devido à sua conformação espacial e devido ao maior número de moléculas na membrana em relação ao colesterol, esta classe de antifúngicos também se liga ao colesterol da membrana de células humanas. Além disso, anfotericina B não é absorvida via oral ou intramuscular e causa problemas renais (GHANNOUM e RICE, 1999; ODDS et al., 2003).

O antifúngico 5-fluorocitosina é transformado pela célula fúngica em um antimetabólito da uracila, inibindo a síntese proteica, além de inibir a timidilato sintase, o que leva à inibição da síntese de DNA. Mostra pouca toxicidade, pois nas células mamíferas a enzima conversora para o antimetabólito tem pouca atividade, mas não é administrado isoladamente já que o fungo desenvolve resistência rapidamente (ODDS et al., 2003).

Alilaminas também atuam na biossíntese de ergosterol inibindo a enzima esqualeno epoxidase (Erg1), atuando em um ponto anterior aos azóis na via pela inibição de formação do precursor de lanosterol (ONYEWU et al., 2003).

Novos antifúngicos vêm sendo desenvolvidos, já estão aprovados e em uso e/ou ainda estão sob estudo para uso clínico. Entre eles, citam-se novas moléculas de azóis, como voriconazol e posaconazol. Embora a estrutura química seja pouco diferenciada quanto ao fluconazol e itraconazol, ela é suficiente para aumentar a potência, o espectro de ação, a biodisponibilidade e ter reduzido potencial tóxico pela inibição do sistema P450 (ODDS et al., 2003).

Equinocandinas são moléculas fúngicas de lipopeptídeos cuja ação está na inibição da atividade do complexo proteico de síntese do polímero de  $\beta$ -1,3-glucana. Seus derivados caspofungina e micafungina estão em uso mas ainda são alvos de



estudos (ESPINEL-INGROFF, 2009). Embora fungicida, concentrações de caspofungina acima do valor inibitório permitem o crescimento de algumas colônias, um efeito paradójico. Stevens et al. (2006) observaram que estas colônias isoladas apresentaram redução de  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6-glucanas mas, em oposição, um expressivo aumento de quitina, indicando que a resistência dessas colônias pode não estar associada a mutações no complexo de  $\beta$ -1,3-glucana sintase ou degradação do fármaco mas sim com um efeito de regulação compensatória na produção de quitina. Por outro lado, já foi reportado um caso clínico de falha no tratamento de candidíase com alta dose de caspofungina em paciente imunossuprimido sugerindo que as células isoladas apresentavam mutação no gene que codifica a enzima  $\beta$ -1,3-glucana sintase (BAIXENCH et al., 2007).

Sordarinas atuam inibindo a síntese de proteínas por bloquear a função do fator de alongamento 2 (EF2) da tradução fúngica, alvo ausente na célula mamífera mas ainda não são utilizadas na terapia (ODDS et al., 2003).

Outras moléculas vêm apresentando atividade antifúngica “in vitro” atuando como inibidores de  $\beta$ -1,6-glucana sintase (KITAMURA et al., 2009) e de quitina sintase, mas sua aplicação clínica depende de mais estudos (ESPINEL-INGROFF, 2009).

A Figura 4 esquematiza os mecanismos e os alvos de classes de antifúngicos utilizadas na terapia neste começo do século XXI.

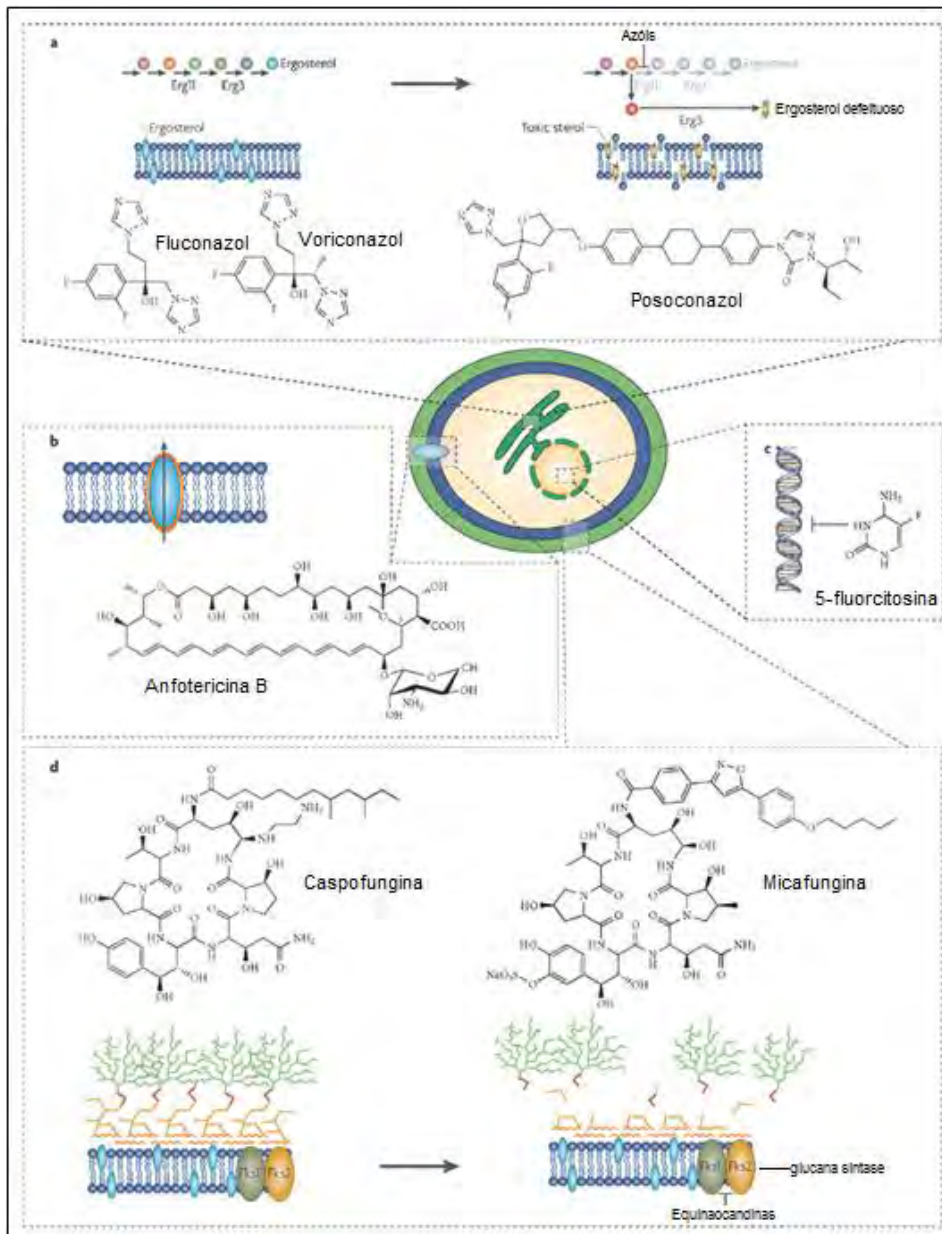


Figura 4: Esquema dos principais alvos de antifúngicos em leveduras (COWEN, 2008).

De modo geral, o tratamento de infecções fúngicas é limitado devido à toxicidade dos fármacos atualmente utilizados, a baixa eficiência de alguns e o desenvolvimento de resistência intrínseca em algumas espécies ou adquirida, devido, principalmente, ao indiscriminado e inadequado uso desses agentes (PATTERSON, 2005; ESPINEL-INGROFF, 2008).

Infecções causadas por cepas de *Candida* spp resistentes a azóis já foram encontradas em todo o mundo; resistência “in vitro” para todos os agentes antifúngicos também já foi encontrada (SOJAKOVA et al., 2004). Cerca de 3,6 a 7,2%

de isolados vaginais de *C. albicans* são resistentes ao fluconazol (SOBEL et al., 2003). Geralmente, as cepas resistentes são mais frequentemente encontradas em indivíduos imunocomprometidos, com AIDS ou sob tratamento contra câncer. Embora já tenha sido relatada a resistência clínica a anfotericina B e “in vitro” a 5-fluorocitosina, a resistência a azóis tem emergido como um problema maior, provavelmente, pelo aumento do uso desta classe, que é fungistática e não fungicida (WHITE et al., 1997).

Portanto, é nítida a necessidade de busca de novos agentes antifúngicos que apresentem menor toxicidade, maior eficácia e com menor número de cepas resistentes (ZHANG et al., 2006; ESCALANTE et al., 2008).

### 1.1.3. Plantas com atividade antifúngica

Partindo desta necessidade e reconhecendo que as plantas são uma fonte de compostos com atividade antimicrobiana, observa-se a existência de estudos bem-sucedidos com extratos, frações e moléculas isoladas de plantas já utilizadas etnofarmacologicamente contra candidíases ou cuja composição química seja um indício desta atividade (LIMA et al., 2006; ZHANG et al., 2006; ALMEIDA et al., 2008; ESCALANTE et al., 2008; ALVES et al., 2009).

*Tribulus terrestris* é uma erva utilizada na Medicina Tradicional Chinesa para o tratamento de prurido cutâneo, edema e inflamação. A atividade contra espécies de *Candida* foi avaliada devido ao isolamento de saponinas, classe de metabólitos tida como antimicrobiana (SAUTOUR et al., 2004), tendo como resultado que algumas moléculas tinham atividade por inibir a formação de hifa e danificar a ultraestrutura das células (ZHANG et al., 2006).

As cascas de *Stryphnodendron adstringens* são usadas pela população brasileira no tratamento de candidíase vaginal, além de outras atribuições. Ishida et al. (2006) foram um dos grupos que corroborou com a atividade anti-*Candida* do extrato das cascas e isolaram um derivado de tanino condensado que apresentou atividade, teve a propriedade de alterar fatores de virulência e mostrou-se de baixa citotoxicidade.

O estudo de Gertsch et al. (2004), realizado na tribo Yanomamĩ, situada na Venezuela, confirmou que as folhas da planta *Phyllanthus piscatorum*, utilizadas para facilitar a pescaria, têm potencial atividade contra *C. albicans*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus*. Somente as mulheres desta tribo cultivam e realizam a pescaria com as folhas de *Phyllanthus piscatorum*. Aquelas que apresentam vulvovaginites entram na água dos lagos onde foram colocadas as folhas de *P. piscatorum* e esperam lá cerca de meia hora até que o primeiro peixe apareça flutuando na superfície da água. Primeiramente, Gertsch et al. (2004) utilizaram em seus estudos extratos das folhas desta espécie obtidos com diclorometano, metanol e água. Todos apresentaram atividade antifúngica, contudo, a melhor atividade foi apresentada com o extrato de diclorometano. A partir disto, foi realizado um fracionamento biodirigido desse último extrato chegando ao isolamento de uma lignana, justicidin B, que apresentou o mesmo efeito biológico do extrato, sendo o principal composto ativo antifúngico de *P. piscatorum* (Gertsch et al., 2003).

Outro exemplo de estudo biomonitorado vem do grupo de Escalante et al. (2008), que isolou dos frutos de *Phytolacca tetramera* Hauman (Phytolaccaceae) um triterpenóide glicosilado, chamado de fitolacosídeo B, para o qual verificou-se atividade antifúngica contra *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus*. O estudo também identificou que o composto promove alterações da parede celular de alguns desses fungos, como aumento da quantidade de quitina.

Seguindo a busca por novos antifúngicos derivados de plantas, este trabalho buscou avaliar a atividade do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e do extrato e derivados das folhas de *Plinia cauliflora* contra cepas de *Candida* procurando elucidar o mecanismo pelo qual atuam e avaliar sua segurança por ensaios de citotoxicidade.

## 1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A família Myrtaceae pertence à ordem Myrtales, que reúne 12 famílias botânicas, e foi descrita por Antoine Laurent de Jussieu (LORENZI, 2000; STASI et al., 2002). Espécies da família Myrtaceae encontram-se distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (BARROSO et al., 1991), sendo divididas em duas subfamílias: Myrtoidea, de ampla ocorrência na América tropical e Leptospermoidea que ocorre, principalmente, na Austrália, Malásia e Polinésia (VIEIRA et al., 2004). É uma das mais importantes famílias de Angiospermae no Brasil, constando de uma única tribo chamada Myrtae e três subtribos que são Myrciinae, Eugeniinae e Myrtinae (LANDRUM e KAWASAKI, 1997). Na família Myrtaceae estão descritos 129 gêneros e 4620 espécies, sendo conhecida por sua elevada riqueza de espécies (STASI et al., 2002).

Alguns dos gêneros pertencentes à família Myrtaceae são *Eugenia*, *Eucalyptus*, *Melaleuca*, *Myrciaria*, *Myrtus*, *Pimenta*, *Psidium* e *Syzygium* (STASI et al., 2002). Estas espécies são arbustivas ou arbóreas, estando presentes em regiões de clima temperado, Austrália, oeste da Índia e América tropical (LORENZI, 2000; STASI et al., 2002).

Esta família tem importante papel relacionado à sua diversidade e ao seu uso pela população nas Florestas do Sul e Sudeste do Brasil (KURTZ e ARAÚJO, 2000; ROMAGNOLO e SOUZA, 2004), sendo um dos grupos arbóreos predominantes da Mata Atlântica (LOMBARDI e GONÇALVES, 2000; LIMA e GUEDES-BRUNI, 1997).

As várias espécies da família Myrtaceae fornecem importantes produtos, como óleos essenciais, temperos, alimentos e, além disso, muitas são utilizadas na medicina tradicional (STASI et al., 2002). Em levantamento bibliográfico realizado por Cruz e Kaplan (2004) foram descritas espécies de Myrtaceae empregadas principalmente em distúrbios gastrintestinais, hemorragias e infecções, cuja ação pode estar relacionada às propriedades adstringentes das plantas. Geralmente, as partes mais usadas são as folhas e cascas sendo que os frutos comumente são comestíveis. As cascas são ricas em taninos, presente também nas folhas que também apresentam flavonóides,

saponinas e óleos essenciais nas cavidades secretoras (METCALFE e CHALK, 1950; GUTIÉRREZ et al., 2008; ISHIKAWA et al., 2008)

### 1.2.1. *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae)

Para Cronquist (1981), o gênero *Melaleuca* inclui aproximadamente 100 espécies nativas da Austrália e ilhas do oceano Índico. Atualmente, são conhecidas, aproximadamente, 230 espécies, localizadas na mesma região já descrita por Cronquist (REICHLING, 2001).

A espécie *Melaleuca alternifolia* Cheel é conhecida na Austrália por “tea tree”, ou seja, árvore do chá, florescendo principalmente em áreas de pântano próximas a rios (RUSSEL e SOUTHWELL, 2002). O termo “tea tree”, aparentemente, foi dado pelo Capitão James Cook em sua viagem exploratória pela Austrália em 1770, quando encontrou um arbusto de Myrtaceae, possivelmente uma espécie de *Leptospermum sp.*, cujas folhas eram usadas pelos marinheiros em substituição ao chá de *Camellia sinensis*.

A planta é do tipo arbustiva, cuja casca sofre descamação e é encontrada, geralmente, na floresta aberta, ao longo de cursos de rios ou limites de pântanos (MELALEUCA..., 2004; MELALEUCA, 2008). Na Figura 5, estão representados arbustos de *M. alternifolia*, folhas e flores.



Figura 5: Fotografias de *M. alternifolia*. A) Planta inteira (*Melaleuca alternifolia* (Cheel.), 2008a). B) Destaque para as flores (*Melaleuca alternifolia* (Cheel.), 2008b).

Os povos nativos da Austrália já utilizavam há milênios *M. alternifolia* quando os colonizadores chegaram, reconheceram suas propriedades terapêuticas e

promoveram a destilação do óleo de suas folhas (CARSON et al., 1998; HALCÓN e MILKUS, 2004). O óleo, por sua vez, é conhecido popularmente como “tea tree oil” e vem sendo muito utilizado como agente antimicrobiano tópico, inicialmente com base em evidências de uso popular (CARSON e RILEY, 1993; SALLER et al., 1998). Ao óleo de *M. alternifolia* são atribuídas várias propriedades, tais como antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiinflamatória e analgésica (PEÑA, 1962; TONG et al., 1992; CARSON e RILEY, 1993; BUCK et al., 1994; HAMMER et al., 1996; HAMMER et al., 1997). O óleo tem uso em tratamento de tinea pedis e onicomicose (WALKER, 1972; TONG et al., 1992; BUCK et al., 1994; SYED et al., 1999; SATCHELL et al., 2002). Alguns trabalhos apresentam o uso com sucesso do óleo no tratamento de infecções de membrana mucosa como *Trichomonas vaginalis* (PEÑA, 1962), bactérias orais e candidíase de orofaringe (JANDOUREK et al., 1998; GROppo et al., 2002). Entre todas, a atividade antibacteriana é a que mais atrai a atenção (CARSON et al., 1995; CARSON et al., 1996; HAMMER et al., 1996; CARSON et al., 1998) uma vez que apresenta amplo espectro de ação contra bactérias e por ter sido demonstrada sua atividade contra cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (HALCÓN e MILKUS, 2004). Diferentes estudos foram realizados demonstrando que muitos dos micro-organismos transientes na pele são mais susceptíveis ao óleo essencial do que os micro-organismos comensais da microbiota, o que proporciona, mesmo com o uso deste óleo, a manutenção da microbiota, que atua como uma barreira contra a colonização de patógenos (HAMMER et al., 1996; CARSON et al., 1998; CARSON e RILEY, 1998; BANES-MARSHALL et al., 2001; HALCÓN e MILKUS, 2004). Também existem estudos que demonstram a atividade contra *Streptococcus pyogenes* (CARSON et al., 1996), estreptococos  $\beta$ -hemolíticos, *Pseudomonas aeruginosa* (BANES-MARSHALL et al., 2001; HALCÓN e MILKUS, 2004), enterococos resistentes a canamicina, *Acinetobacterbaumannii*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (CARSON e RILEY, 1995; CARSON et al., 1995; HAMMER et al., 1996; NELSON, 1997).

Em seu estudo, Benger et al. (2004) apresentaram o valor de 0,1% do óleo essencial como concentração fungistática para *Tricophyllum rubrum*. Hammer et al. (1998) e Carson et al. (1998) verificaram que isolados clínicos de diferentes espécies

de *Candida* spp e algumas linhagens de referência são susceptíveis a diluições menores ou iguais a 0,5% do óleo. Também foi demonstrada a capacidade do óleo essencial em promover a diferenciação “in vitro” de monócitos (BUDHIRAJA et al., 1999). As propriedades antiinflamatórias contribuem com a cura de feridas crônicas e são baseadas na supressão da produção de mediadores inflamatórios pela ativação dos monócitos (FINLAY-JONES et al., 2001; HART et al., 2000). Um estudo realizado com 27 voluntários demonstrou que o óleo pode reduzir inflamação da pele induzida por histamina (KOH et al., 2002; HALCÓN e MILKUS, 2004).

O óleo essencial de *M. alternifolia* é hidrodestilado das folhas e ramos, apresentando-se como um líquido límpido e com odor distinto (HALCÓN e MILKUS, 2004). A exata constituição do óleo é variável. De acordo com Organizações Internacionais e Australianas de Padronização, este óleo essencial tem um perfil cromatográfico variável dentro da composição apresentada na Tabela 1. Atualmente, o padrão ISO 4730 (INTERNATIONAL..., 1996) é o mais compreensivo por definir os parâmetros físicos e químicos que as amostras do óleo devem apresentar (CARSON et al., 1998).

O óleo essencial dessa espécie contém, aproximadamente, 100 componentes, dos quais terpinen-4-ol, 1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineol, terpinoleno e  $\alpha$ - e  $\gamma$ -terpineno compreendem cerca de 90% da constituição do óleo (BROPHY et al., 1989) e estão exemplificados na Figura 6. No padrão ISO 4730, são apresentados 14 componentes do óleo que em algumas amostras devem estar presentes, entre eles, terpinen-4-ol e  $\alpha$ -terpineol, que são considerados os principais para a atividade antimicrobiana (CARSON e RILEY, 1995; CARSON et al., 1998).



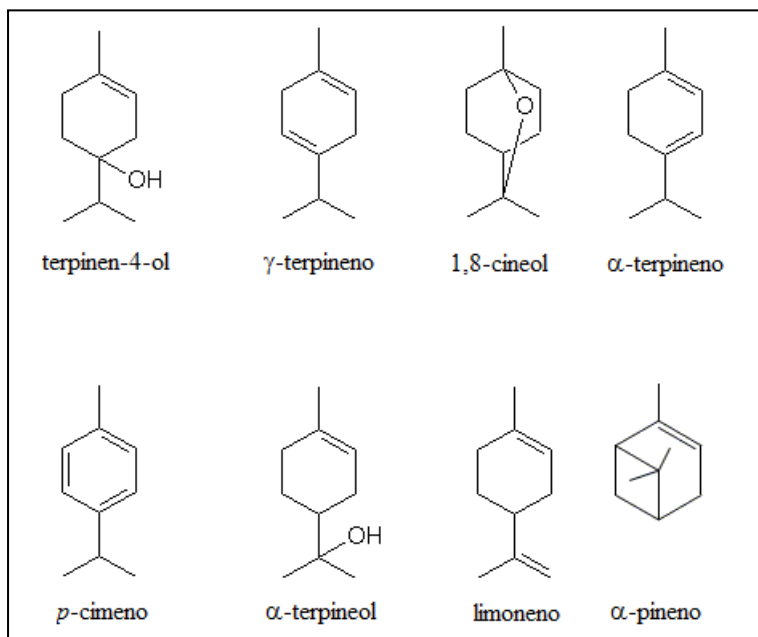


Figura 6: Exemplos das moléculas presentes no óleo essencial de *M. alternifolia* (TEEBAUMÖL, 2010).

Tabela 1: Principais componentes do óleo essencial de *M. alternifolia*.

Componentes	Padrão Australiano AS2782-1997 (%)	ISO 4730 (%)
$\alpha$ -pineno	1 - 6	1 - 6
sabineno	Traços - 3,5	Traços - 3,5
$\alpha$ -terpineno	5 - 13	5 - 13
limoneno	0,5 - 4	0,5 - 1,5
<i>p</i> -cimeno	0,5 - 12	0,5 - 8
1,8-cineol	0 - 15	Traços - 15
$\gamma$ -terpineno	10 - 28	10 - 28
terpinoleno	1,5 - 4	1,5 - 5
terpinen-4-ol	30	30 - 48
$\alpha$ -terpineol	1,5 - 8	1,5 - 8
aromadendreno	Traços - 7	Traços - 3
$\Delta$ -cadineno	Traços - 8	Traços - 3
globulol	Traços - 3	Traços - 1
viridiflorol	Traços - 1,5	Traços - 1

É indicado que a substância terpinen-4-ol é a principal responsável pelas propriedades medicinais do óleo essencial de *M. alternifolia* (RUSSEL e SOUTHWELL, 2002).

Terpinen-4-ol, linalol e  $\alpha$ -terpineol são substâncias do óleo essencial bem estudadas pela atividade antibacteriana que apresentam (KNOBLOCH et al., 1986; HINOUE et al., 1989; CARSON et al., 1996; SOUTHWELL et al., 1997; CHRISTOPH et al., 2000; MAY et al., 2000). Estas substâncias indicam afetar a parede celular bacteriana o que é demonstrado pela tolerância a sais e presença de estruturas parecidas com mesossomo por microscopia eletrônica após tratamento de *Staphylococcus aureus* com o óleo essencial de *M. alternifolia*, além de comprometer a membrana citoplasmática de *S. aureus*, conferindo atividade bacteriostática e bactericida ao óleo (CHRISTOPH et al., 2001; CARSON et al., 2002; HALCÓN e MILKUS, 2004).

Também foi observado que a substância terpinen-4-ol isolada apresentou menor atividade antimicrobiana do que o óleo essencial por completo (MILLER, 1984).

Embora terpinen-4-ol seja considerado o principal responsável pelas propriedades terapêuticas do óleo de *M. alternifolia*, por outro lado a substância 1,8-cineol indica possuir propriedades irritantes e tóxicas (BUDHIRAJA et al., 1999).

De forma geral, o perfil toxicológico do óleo essencial indicou que reações graves são raras quando não ingerido. A dose letal 50 oral em ratos foi de 1,9 a 2,6 mL/kg, a dose letal 50 dérmica aguda em coelhos foi de 5,0 g/kg do óleo puro mantido por 24 h e pelo teste de irritação de Draize o óleo essencial puro apresentou poder causar irritação em alguns usuários (FORD, 1988; SALLER et al., 1998). Teste de Hayes et al. (1997) demonstrou que a citotoxicidade “in vitro” do óleo puro foi de 0,02 a 2,8 g/L e que as linhagens de células hepáticas foram as mais sensíveis. Além destes estudos, existem relatos clínicos de sensibilidade dérmica, dermatite de contato e toxicidade oral (APTED, 1991; SELVAAG et al., 1994; VILLAN et al., 1994; SELVAAG et al., 1995; HALCÓN e MILKUS, 2004). Contudo, estudo anterior apresentou que a pele humana mostrou-se menos permeável a óleos essenciais do que a de rato, coelho ou porco sendo que esta última é a que tem maior semelhança

com a permeabilidade da pele humana. Foi demonstrado que os efeitos tóxicos que são apresentados por animais podem não refletir o real potencial de penetração ou efeitos sistêmicos que os óleos essenciais têm na pele humana (BARTEK et al., 1972; HALCÓN e MILKUS, 2004).

Estudo de mutagênese utilizando o método de Ames com *Salmonella* demonstrou que nem o óleo essencial nem terpinen-4-ol induziram mutações reversas, indicando que ambos não são mutagênicos nem carcinogênicos, por esta metodologia "in vitro" (SNYDER e GREEN, 2001; FLETCHER et al., 2005).

Embora exista considerável número de estudos sobre a composição do óleo essencial, poucos relatos existem sobre a composição química dos diferentes órgãos de *M. alternifolia*. O estudo da composição química do caule desta espécie indicou a presença de ácido 3,3'-*O*-dimetilelágico, os triterpenos pentacíclicos ácido 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-triidroxiolean-12-en-28-óico (ácido arjunólico), ácido 3 $\beta$ -hidroxilup-20(29)-en-27,28-dióico (ácido melalêucico) e ácido betulínico, alguns ácidos e ésteres graxos. Da casca foram isolados os triterpenos pentacíclicos ácido betulínico, betulina e ácido 3 $\beta$ -*O*-acetilurs-12-en-28-óico, hidrocarbonetos entre outros compostos. A partir do caule, por cromatografia gasosa foram identificados os compostos 4-metileptan-3-ona, undecan-2-ona, 3,4,5-trimetoxifenol, hepta-2,4-dien-6-inal e 6-hidroxiexanoato de metila e a partir de extrato apolar da casca foi identificada a presença dos hidrocarbonetos decano, 6-metildec-4-eno, undecano, dodecano, tridecano, tetradecano (VIEIRA et al., 2004).

Por ser nativa da Austrália este país é o principal produtor do óleo essencial de *M. alternifolia*, dominando o mercado e as tecnologias de produção. Entretanto, o consumo desse óleo essencial está disperso por todo o mundo pelas indústrias farmacêutica, de cosméticos e de limpeza sendo a América do Norte e a Europa os principais consumidores. O monopólio de produção acarreta em elevado custo do óleo. No Brasil, o consumo desse produto também vem aumentando, observando-se seu uso por indústrias de cosméticos e em casas de produtos naturais que o importam repassando o custo ao consumidor final. A implantação do cultivo e extração do óleo essencial de *M. alternifolia* no Brasil traria benefícios como maior utilização terapêutica desse produto pela população a menor custo e a geração de

empregos e rendas ao país. Trabalho realizado até o segundo ano de cultivo, utilizando os principais indicadores econômicos, por meio do levantamento dos custos e receitas do cultivo da planta e extração do óleo essencial revelou que os custos maiores foram da manutenção da cultura, que o risco de o investimento apresentar-se inviável é baixo, a cultura apresentou potencial de geração de emprego no meio rural e a produção média diária de óleo foi de 150 mL, com produção anual de 81,8 L/há utilizando-se espaçamento de 1 x 1 m (CASTRO et al., 2005).

### 1.2.2. *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Myrtaceae)

*Plinia cauliflora* é uma planta tipicamente brasileira pertencente à família Myrtaceae, conhecida popularmente por jaboticabeira, jaboticaba, jaboticaba paulista, jaboticaba-açu, jaboticaba-do-mato e jaboticaba-sabará (OCHSE et al., 1966; LORENZI, 2000; CITADIN et al., 2005; JABOTICABA, 2007).

O gênero inicialmente chamado de *Myrciaria* por Berg em 1857 foi alterado para o gênero *Plinia* pela proposta de Sobral em 1985 (SOBRAL, 1985).

*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg, *Myrtus cauliflora* Mart., *Myrciaria cauliflora* (DC.) Berg, *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg, *Eugenia cauliflora* DC e *Myrciaria jaboticaba* Berg, *Myrciaria tenella* Berg e *Myrciaria trunciflora* Berg são nomes científicos atribuídos às jaboticabeiras em geral mas alguns correspondem a diferentes espécies e não a sinônimas de *Plinia cauliflora*. Existe uma grande confusão entre as espécies de jaboticabeiras, principalmente entre *P. cauliflora* e *P. jaboticaba* devido às semelhanças ocasionadas por um alto grau de similaridade genética. O estudo de Pereira et al. (2005) enumera as características morfológicas próprias de *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O. Berg, *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg, *Myrciaria phitrantha* (Kiaersk.) Mattos e *Myrciaria coronata* além de analisar as características moleculares destas espécies traçando um dendrograma de similaridade genética entre as mesmas e, assim, favorecendo a correta classificação destas espécies.

Segundo Mattos (1978), existem nove espécies de jaboticabeiras sendo que dentre elas destacam-se a *Plinia truncifolia* (DC) Berg, ou jaboticabeira de cabinho, de ocorrência natural na região Sudoeste do Paraná, a *Plinia cauliflora* que é a jaboticaba

paulista e a *Plinia jaboticaba* (Vell.) ou jaboticaba sabará, que produz frutos apropriados para a indústria e para o consumo “in natura” (DONADIO, 1983; MATTOS, 1983).

Morfologicamente, a *P. cauliflora* é uma árvore de altura entre 10-15 m, com tronco liso de 30-40 cm de diâmetro, cuja casca descama anualmente. As folhas são simples, de 6-7 cm de comprimento por 2-3 cm de largura e as flores e frutos são afixados ao caule, característica pela qual se atribui seu nome (Figura 7). Planta perenifólia, mesófita ou heliófita e seletiva higrófita, ocorrendo, preferencialmente, em planícies aluviais e matas abertas do litoral e m submatas do planalto, situadas em baixadas e beira de rios, sendo encontrada nas formações florestais do complexo atlântico e das florestas estacionais semidecíduais do Brasil, Argentina e Paraguai. É rara no interior da floresta primária sombria (BARROS et al., 1996; MAGALHÃES et al., 1996; DONADIO, 2000; LORENZI, 2000).



Figura 7: Fotografias de *P. cauliflora*. A) Árvore (foto tirada por Adriana Baraldo Lotrario). B) Destaque para as folhas. C) Destaque para as flores. D) Destaque para os frutos (FRUITS lovers nursery, 2008).

Floresce geralmente duas vezes por ano nos meses de julho-agosto e novembro-dezembro, com amadurecimento dos frutos em agosto-setembro e janeiro-fevereiro. As flores recobrem a periferia dos ramos dando à planta característica de ornamental. Produz grande quantidade de frutos o que garante sua regeneração

natural nas regiões de origem (DONADIO, 2000; LORENZI, 2000; DONADIO et al., 2002). Os frutos são globosos, atingindo até 3,5 cm de diâmetro, de polpa branca e sabor subácido com sementes variando de ovais a redondas e lateralmente compridas, podendo chegar a até quatro por fruto (BENZA, 1980). Devido às suas características organolépticas, os frutos são comestíveis e saborosos, tendo valor comercial para consumo ao natural, na fabricação de licores e geléias, xaropes, vinho e vinagre (BARROS et al., 1996; DONADIO, 2000; LORENZI, 2000; DONADIO et al., 2002). Estudos demonstraram que a principal constituição dos frutos é de açúcares redutores e não-redutores, minerais, vitamina C, derivados de antocianina e amido na semente (BARROS et al., 1996; EINBOND et al., 2004).

A casca de *P. cauliflora* é adstringente e o seu decocto é útil contra diarreia e irritações da pele (LORENZI, 2000; JABOTICABA, 2007). Têm-se informações de que na medicina caseira o chá-da-casca é utilizado no tratamento de anginas, disenterias e erisipelas, enquanto que o chá da entrecasca do fruto destina-se a tratamento de asma (JABOTICABA, 2007).

Embora seja uma espécie nativa muito utilizada no Brasil, apresentando ampla disponibilidade e fácil acesso, ainda não foram encontrados relatos na literatura sobre estudos da constituição fitoquímica ou atividades biológicas das folhas. Nosso trabalho anterior (SOUZA, 2010) com *P. cauliflora* indicou que extrato hidroalcoólico das folhas possui teor de fenóis totais superior a 40%, com predominância de flavonóides e taninos e este extrato apresentou significativa atividade antifúngica contra espécies de *Candida*, com concentração inibitória mínima (CIM) próxima a 625 µg/mL.

## 2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi estudar a atividade antifúngica e o mecanismo de ação que são apresentados pelos metabólitos secundários do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel e do extrato de *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel contra leveduras do gênero *Candida*.

Para isto, foram necessários os seguintes Objetivos Específicos:

- Avaliação da composição do óleo essencial de *M. alternifolia*.
- Obtenção do extrato etanol 70% das folhas *P. cauliflora* e determinação do perfil cromatográfico.
- Obtenção e análise de composição de frações do extrato das folhas de *P. cauliflora* para estudo químico biodirigido.
- Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *M. alternifolia*, do extrato e das frações de *P. cauliflora* e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM).
- Avaliação do efeito das amostras vegetais na curva de crescimento das leveduras.
- Avaliação da citotoxicidade do óleo essencial de *M. alternifolia*, do extrato e das frações de *P. cauliflora*.
- Avaliação do efeito das amostras vegetais na morfologia das leveduras.
- Investigação do mecanismo de ação das amostras vegetais sobre ergosterol.
- Investigação do mecanismo de ação das amostras vegetais na parede celular das leveduras.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL

##### 3.1.1. Solventes, reagentes e meios de cultura

- 2,4-dinitrofenilhidrazina
- acetato de etila – Labsynth
- acetato de uranila – Sigma-Aldrich
- acetonitrila – Labsynth
- ácido 3-[N-morfino] propanosulfônico (MOPS) – Acros Organics
- ácido acético – Labsynth
- ácido clorídrico – Labsynth
- ácido etilenodiamino tetracético (EDTA), sal sódico – Sigma-Aldrich
- ácido gálico – Vetec
- ácido pícrico – Vetec
- ácido sulfúrico – Labsynth
- ácido tânico – Vetec
- ácido trifluoroacético – Labsynth
- ácido trifluoroacético 2M – Sigma-Aldrich
- água destilada
- anfotericina B de *Streptomyces* – Sigma-Aldrich
- *p*-anisaldeído – Carlo Erba
- bicarbonato de sódio – Merck
- *n*-butanol – Labsynth
- Calcofluor white, Fluorescent brightener 28 – Sigma Aldrich
- carbonato de sódio – Merck
- caseína em pó – Acumedia
- citrato de chumbo – Sigma-Aldrich
- cloreto de alumínio – Labsynth
- cloreto de potássio – Labsynth



- cloreto de sódio - Labsynth
- clorofórmio - Labsynth
- “complete mini-EDTA free tablet, protease inhibitor cocktail” - Roche
- corante azul de toluidina
- corante Sudan III
- corante sulfato azul do Nilo
- DEAE-dextrana - Sigma-Aldrich
- dimetilformamida - Labsynth
- dimetilsulfóxido - Labsynth
- dimetilsulfóxido deuterado - Sigma Aldrich
- dodecilsulfato de sódio- Sigma Aldrich
- ergosterol - Sigma Aldrich
- etanol - Labsynth
- extrato de levedura - Acumedia
- glicerina - Labsynth
- glicosamina - Sigma Aldrich
- glicose - Sigma Aldrich
- *d*-glicose anidra - Labsynth
- glutaraldeído solução 50% grau puro - Electron Microscopy Sciences
- fosfato dibásico de sódio - Labsynth
- fostato monobásico de potássio - Labsynth
- fluconazol - Sigma Aldrich
- fluoreto de fenilmetilsulfonato - Sigma Aldrich
- “glass beads acid washed” 425-600  $\mu\text{m}$  - Sigma Aldrich
- hexano - Labsynth
- hidróxido de potássio - Merck
- hidróxido de sódio - Labsynth, Sigma Aldrich
- hipoclorito de sódio - Cuccaro & Cia
- lâmina de poli-*L*-lisina - Thermo Scientific
- manose - Sigma Aldrich
- meio ágar Sabouraud - Acumedia

- meio ágar Müeller Hinton - Acumedia
- meio Leibovitz - Himedia
- meio Mínimo de Eagle - Sigma-Aldrich
- meio RPMI-1640 - Sigma-Aldrich
- $\beta$ -mercaptoetanol - Sigma-Aldrich
- metanol - Labsynth
- nitrogênio líquido
- ouro
- *n*-propanol - Labsynth
- peptona de carne - J.T. Baker
- poli-*L*-lisina (50 kDa) - Sigma-Aldrich
- quercetina - Vetec
- reagente Coomassie para ensaio de proteínas - Thermo Scientific
- reagente de Folin-Ciocalteau - Imbralab
- reagente de Nadi
- rezasurina - Sigma-Aldrich
- rutina - Vetec
- sorbitol - J.T. Baker
- soroalbumina bovina - Thermo Scientific
- soro bovino fetal - Gibco
- tetróxido de ósmio - Labsynth
- tricloreto de antimônio - Labsynth
- tripsina-EDTA - Sigma Aldrich
- Tris-HCl - Sigma Aldrich
- Tween 80 - Labsynth
- vanilina - Labsynth

### 3.1.2. Equipamentos

- Agitador orbital - Innova 4430
- Autoclave vertical - Fabbe 103

- Balança analítica – Micronal AB 204
- Balança analítica – Ohaus Adventurer-Pro
- Balança semi-analítica – Owa Labor
- Balança semi-analítica – Toledo Mettler
- Banho de aquecimento – Fistom
- Banho-maria – Fanem Mod.1100
- “Bead Beater” – Biospec Products Mini-BeadBeater 8
- Bloco de aquecimento – Techne Dri Block DB-2A
- Bomba de vácuo – Motores Elétricos Brasil
- Bomba peristáltica – Pharmacia P1 18-1110-91
- Câmara de fluxo laminar – Veco
- Câmara de Neubauer - Boeco
- Câmara de ultravioleta 254 nm
- Centrífuga – Excelsa Baby
- Centrífuga Refrigerada – Eppendorf 5415 R com rotor fixo
- Centrífuga Refrigerada – Sorvall Legend RT com Rotor tipo “swing out”
- Coluna de Sephadex LH-20: Bomba peristáltica marca Pharmacia, modelo P1 18-1110-91, conectada a uma coluna de vidro (100 x 3 cm d.i.) e a um coletor automático de frações marca Pharmacia, modelo RedFrac, com capacidade para 95 frações
- Cromatógrafo a gás – Varian CP - 3800, equipado com injetor automático Varian CP 8200m, detector Varian CP 2000, coluna VF-5MS (5% fenil 95% metilpolissiloxano) com 30 m de comprimento x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm de espessura do filme
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodos – série Varian ProStar 210/330, equipado com uma coluna analítica de fase reversa C18, modelo Luna (2) (Phenomenex) de 250 x 4,6 mm, apresentando partículas com tamanho de 5 µm e poro com diâmetro interno de 100 Å e uma coluna de guarda (Phenomenex) de 4 x 3 mm. Injetor Rheodyne 7125 (Rheodyne) com um loop de 20 µL

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de pulso eletroquímico – Dionex BioLC, equipado com uma coluna analítica de troca aniônica, modelo CarboPac PA1 (Dionex) de 4 x 250 mm, apresentando partículas com tamanho de 10  $\mu\text{m}$  e uma coluna de guarda (Dionex) de 4 x 50 mm
- Cromatógrafo contra-corrente de alta velocidade – Potomac Inc, equipado com uma coluna tripla de teflon de 1,68 mm d.i., com tubos de PTFE com capacidade total de 320 mL, com valor de  $\beta = 0,50$  na extremidade interna e 0,85 na extremidade externa e raio de revolução de 10 cm. A amostra foi injetada através de um Injetor P.C. Inc. com *loop* de 16 mL. Bomba de HPLC Waters PrepLC 4000 System. Coletor automático EYELA DC-1200 com capacidade para 120 frações
- Cromatógrafo líquido de média eficiência – Pump Manager (Büchi) equipado com uma coluna de sílica gel 60H de medidas 17,5 x 1,5 cm. A amostra foi injetada através de um Injetor C-615, com *loop* de 5 mL. Bombas modelo C-60, com capacidade de 2,5 a 50 mL/min e empacotador de colunas modelo C-670 acoplado à bomba à vácuo, TE-058, marca Tecnal
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear – Varian INOVA 500, operando a 11,7 T
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear – Bruker DRX 200 MHz.
- Espectrômetro de Massas - Thermofinnigan TSQ Quantum Ultra AM system, equipado com fonte electrospray (voltage 3.0 kV, nitrogênio; temperatura de vaporização 50 °C; temperatura do capilar: 250 °C), acoplado a um cromatógrafo Surveyor Plus micro-HPLC (Thermo Electron), com coluna Ultrasep ES RP18E (5 mm, 1x100 mm, SepServ)
- Espectrofotômetro – Shimadzu-1603
- Espectrofotômetro – ThermoSpectronic Biomate5
- Estufa de ar circulante – Fanem
- Estufa de esterilização – Fanem 315 SE
- Estufa de incubação bacteriológica – Olidex cz
- Estufa de incubação de CO<sub>2</sub> – Thermo Electron Corporation Forma Series II Hepa Class 100

- Evaporador rotatório - Marconi TE120
- Freeze-Drier - Edwards Modulyo
- Freeze substitution system - Leica Microsystems AFS
- High-pressure freezer - Leica Microsystems EM PACT
- Incubadora Refrigerada com Agitação - Tecnal TE422
- Leitor de fluorescência- Tecan Spectra Fluor Plus acoplado ao programa Magellin
- Leitor de microplaca - MDS Analytical Technologies Versamax acoplado ao programa Softmax
- Liofilizador - Solab
- Microfiltro 0,22  $\mu\text{m}$  - Millipore
- Microscópio - Carl Zeiss Jena
- Microscópio - Carl Zeiss Jena acoplado ao programa DC Viewer
- Microscópio de fluorescência - Zeiss Axioplan 2 acoplado ao programa Openlab Openlab v 4.0.4 - Improvision
- Microscópio eletrônico de transmissão - Philips CM 10 acoplado a câmera digital Gatan Bioscan 792
- Microscópio eletrônico de varredura - Topcon SN300
- Microscópio invertido de fluorescência - Nikon Eclipse TE300 acoplado ao programa Image-Pro Plus
- Moinho de facas - Fabbe
- Peagômetro - Micronal B374
- Placa de alumínio de sílica gel 60 F<sub>254</sub> - Merck
- Placas de 96-wells "flat bottom" - TPP, Costar
- Processador de tecido - Lynx
- Sistema de purificação de água - Millipore MilliQ Biocel
- TAAB812 epoxy resin - TAAB Laboratory Equipment Ltd
- Ultramicrótomo - Leica Microsystems Ultracut E
- Vidrarias em geral
- Vórtex - Vision KMC 1300 V

### 3.1.3. Material vegetal

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* foi adquirido comercialmente da empresa Oficina de Ervas – Fitoterápicos, situada em Ribeirão Preto, São Paulo, Lote 326, Farmacêutica Responsável Regina Tomie Kamimura.

As folhas de *Plinia cauliflora* foram coletadas no mês de dezembro de 2006, na cidade de São Carlos, estado de São Paulo (22°01'16.6"S; 47°53'57.0"W), em propriedade particular. Exsiccatas desta espécie foram identificadas por Marcos Sobral e um exemplar foi depositado no Herbário da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ – USP – Piracicaba, SP (ESA nº 96038). As folhas foram secas durante quatro dias em estufa de ar circulante a 40 °C, pulverizadas em moinho de facas e armazenadas em local fresco sem umidade.

### 3.1.4. Micro-organismos

Os ensaios microbiológicos foram conduzidos utilizando cepas obtidas do "American Type Culture Collection" (ATCC): *Candida albicans* – ATCC 64548, *Candida krusei* – ATCC 6258, *Candida parapsilosis* – ATCC 22019 e *Candida tropicalis* – ATCC 750. Os ensaios realizados durante o estágio no "Institute of Medical Sciences" foram conduzidos com a cepa clínica de *C. albicans* SC5314, isolada primeiramente de um paciente com candidíase disseminada (GILLUM et al., 1984).

### 3.1.5. Célula de mamífero

A avaliação da citotoxicidade do óleo essencial de *M. alternifolia* e das amostras de *P. cauliflora* foi realizada com células de fibroblastos da córnea de coelho, linhagem SIRC ATCC CCL-60.

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Análises fitoquímicas

#### 3.2.1.1. Óleo essencial de *M. alternifolia*

##### Perfil cromatográfico do óleo essencial por cromatografia em camada delgada

O perfil cromatográfico do óleo essencial de *M. alternifolia* foi obtido por cromatografia em camada delgada (CCD) a partir da diluição do óleo em hexano (1:50; v/v). Utilizou-se como fase móvel uma mistura de hexano:acetato de etila (8:2; v/v). A placa cromatográfica foi revelada com solução de anisaldeído sulfúrico, aquecimento e visualizada sob luz UV de 254 nm.

##### Perfil cromatográfico do óleo essencial por cromatografia gasosa

Para complementar a análise do óleo essencial, foi realizada cromatografia gasosa acoplada a detector de espectro de massas (CG-EM). A identificação dos picos foi feita mediante comparação com as bibliotecas Nist 107 e Saturno, juntamente com análise dos dados da literatura. A metodologia empregada foi a descrita por Adams (2001). O óleo foi diluído a 1:10 (v/v) em hexano, filtrado em microfiltro de 0,45 µm e analisado em duplicata. Temperatura do injetor: 250 °C; rampa de aquecimento de 60 a 240 °C (3 °C/min); temperatura do trap: 230 °C; temperatura da interface: 180 °C; volume de injeção: 1 µL, modo *split* - 1:20; fluxo do gás de arraste 1 mL/min; intervalo de detecção: 40 a 600 daltons.

#### 3.2.1.2. Folhas de *P. cauliflora*

##### Histoquímica das folhas

Foram feitos cortes transversais das folhas de *P. cauliflora* para estudos botânicos histoquímicos. Alguns destes cortes foram descorados (retirada de

clorofila, verde) em solução de hipoclorito de sódio 2%, por 10 min, submetidos a uma sequência de etanol-acetona-hexano por 5 min cada, reidratados e lavados em água destilada por 5 min para serem utilizados como controle negativo.

Coloração com Azul de Toluidina: cortes foram colocados em água destilada, depois em solução do corante Azul de Toluidina a 0,05% em tampão fosfato pH 6,8 por 3 min, lavados em água destilada, colocados sobre a lâmina, com glicerina, e cobertos com lamínula para visualização ao microscópio. Todas as células e estruturas são coradas em azul, permitindo melhor visualização anatômica, uma vez que este corante não é específico (KRAUS e ARDUIN, 1997).

Coloração com SUDAN III: cortes lavados em água destilada foram colocados em etanol 80%, sendo, posteriormente, colocados na solução do corante SUDAN III por 15 min, lavados em etanol 80% por 1 min, colocados sobre a lâmina, com glicerina, e cobertos com lamínula para visualização ao microscópio. Os lipídeos totais são evidenciados em vermelho (JOHANSEN, 1940).

Coloração com 2,4-dinitrofenilhidrazina: cortes foram colocados em solução saturada de 2,4-dinitrofenilhidrazina em ácido clorídrico 2N por 10 min, lavados por 1 min em água destilada, colocados sobre a lâmina, com glicerina, e cobertos com lamínula para visualização ao microscópio. A presença de terpenos é evidenciada pela coloração vermelho-alaranjada (GANTER e JOLLÉS, 1969-1970).

Coloração com tricloreto de antimônio: cortes foram colocados em solução saturada de tricloreto de antimônio em ácido perclórico a 60% por 3 min, lavados por 1 min em água destilada, colocados sobre a lâmina, com glicerina, e cobertos com lamínula para visualização ao microscópio. A presença de terpenos esteroidais é evidenciada pela coloração vermelho-alaranjada (HARDMAN e SOFOWORA, 1972).

Coloração com ácido sulfúrico: cortes foram colocados em ácido sulfúrico 10%, colocados sobre a lâmina, com glicerina, e cobertos com lamínula para visualização ao microscópio. A presença de lactonas sesquiterpênicas é evidenciada pela coloração vermelho-acastanhada (GEISSMAN e GRIFFIN, 1971).

Coloração com sulfato Azul do Nilo: cortes foram colocados em solução de sulfato de Azul do Nilo a 0,01% por 5 min a 60 °C, depois colocados em ácido acético a 1% por 1 min na mesma temperatura, lavados com água destilada, colocados sobre



lâmina com glicerina e cobertos com lamínula para visualização ao microscópio. Os lipídeos neutros coram-se de cor-de-rosa e os lipídeos ácidos, de azul (CAIN, 1947).

Coloração com tetróxido de ósmio: cortes foram colocados em solução de tetróxido de ósmio a 1% por 1 h em capela, lavados com água destilada, colocados sobre lâmina com glicerina e cobertos com lamínula para visualização ao microscópio. Os lipídeos insaturados coram-se de preto (GANTER e JOLLÉS, 1969-1970).

Coloração com reagente de Nadi: cortes são colocados em reagente de Nadi recém-preparado por 1 h, no escuro, sob temperatura ambiente, lavados em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,2 por 2 minutos, colocados sobre lâmina com glicerina e cobertos com lamínula para visualização ao microscópio. As essências são coradas de azul e os ácidos resínicos, de vermelho escuro (DAVID e CARDE, 1964).

Coloração com cloreto férrico: cortes foram colocados em solução de cloreto férrico a 2%, lavados com água destilada, colocados sobre lâmina com glicerina e cobertos com lamínula para visualização ao microscópio. Os compostos fenólicos são corados em preto (JOHANSEN, 1940).

Coloração com vanilina clorídrica: cortes foram colocados em solução 0,5% de vanilina em ácido clorídrico 9% por 10 min, montados em ácido clorídrico a 9% sobre a lâmina e cobertos com lamínula para visualização ao microscópio. O corte de controle é feito sem adição dos reagentes. A presença de taninos é evidenciada pela coloração vermelha (VALETTE et al., 1998).

Coloração com ácido pícrico: cortes foram colocados em solução de ácido pícrico por 1 min, lavados em água destilada, colocados sobre lâmina com glicerina e cobertos com lamínula para visualização ao microscópio. Os compostos de alcalóides são corados de castanho-avermelhado.

#### Obtenção do extrato e das frações

O extrato das folhas de *P. cauliflora* foi obtido por percolação a partir de 80 g da droga pulverizada segundo o Processo Geral P, descrito na Pharmacopéia dos Estados Unidos do Brasil (1926), utilizando etanol 70% (EtOH 70) como solvente

extrator (SOUZA et al., 2010). Posteriormente, o solvente orgânico foi concentrado sob pressão reduzida e a água foi retirada por liofilização, obtendo-se o extrato seco das folhas, que foi pesado e armazenado em dessecador para evitar que incorporasse umidade.

Uma quantidade de 15 g do extrato das folhas de *P. cauliflora* foi solubilizada em 500 mL de água. Em seguida, realizaram-se partições sucessivas por extração líquido-líquido com acetato de etila 1:1, v/v (3x), seguido por *n*-butanol, 1:1 v/v, (5x), obtendo-se as frações orgânicas acetato de etila (FrAcOEt) e butanólica (FrBuOH) e a fração aquosa (FrAq). As frações foram secas sob pressão reduzida, transferidas para recipientes de vidro pesados e colocadas em capela sob jato de ar comprimido. Estas frações foram analisadas primeiramente por cromatografia em camada delgada (CCD) em placa de alumínio de sílica gel 60 F<sub>254</sub> e com fase móvel composta pela fase orgânica da mistura clorofórmio:metanol:*n*-propanol:água (5:6:1:4; v/v) e revelada com anisaldeído sulfúrico, aquecimento e visualização sob luz ultravioleta de 254 nm (SEVERI et al., 2010).

### Análise quantitativa

#### Determinação do teor de fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 760 nm, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico, segundo a metodologia de Folin e Ciocalteau (1927) adaptada por Monteiro et al. (2006).

Foram analisadas as amostras EtOH 70, FrAcOEt, FrBuOH e FrAq obtidas das folhas de *P. cauliflora* e a determinação do teor de fenóis totais foi realizada utilizando uma curva analítica estabelecida com soluções de concentração conhecida de ácido tânico. Os resultados foram expressos, pela média de três determinações, em porcentagem da concentração de fenóis totais frente à concentração inicial de leitura das amostras.

A partir de uma solução aquosa 1 mg/mL de ácido tânico, diferentes alíquotas foram diluídas em 7,5 mL de água destilada, adicionando 0,5 mL do reagente de

Folin-Ciocalteu 10% em solução aquosa e depois, 1,0 mL de carbonato de sódio 0,75% em solução aquosa, completando o volume para 10,0 mL com água destilada. As concentrações de leitura foram de 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 e 10,0 µg/mL. As amostras vegetais foram preparadas da mesma forma a partir de uma solução em água destilada com concentração final de 10 µg/mL. A leitura foi feita após 3 h de reação colorimétrica no escuro.

#### Determinação do teor de taninos totais

A determinação do teor de taninos totais foi feita pelo método de precipitação com caseína com leitura em espectrofotômetro a partir da mesma reação colorimétrica da metodologia de Folin e Ciocalteu (Monteiro et al., 2006).

As amostras EtOH 70, FrAcOEt, FrBuOH e FrAq em solução aquosa na concentração de 1 mg/mL foram misturadas (0,6 mL) a 0,1 g de caseína em pó, adicionando 1,2 mL de água destilada e levando a agitação por 3 h a temperatura ambiente. Em seguida, as misturas foram centrifugadas, sendo diluídos 500 µL do sobrenadante na proporção 1:1 em água destilada. Alíquotas de 500 µL foram retiradas e preparadas de acordo com o método anteriormente descrito de Folin-Ciocalteu. A quantidade de taninos corresponde à diferença de absorvância entre o teor de fenóis totais das amostras previamente analisadas e o teor de fenóis totais realizado após a precipitação com caseína. Os resultados foram expressos, pela média de três determinações, em porcentagem da concentração de taninos totais frente à concentração inicial de leitura das amostras.

#### Determinação do teor de flavonóides totais

A determinação do teor de flavonóides totais foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 430 nm, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico, segundo a metodologia de Quettier-Deleu et al. (2000).

Como branco foi utilizada solução de metanol puro. As amostras analisadas foram EtOH 70, FrAcOEt, FrBuOH e FrAq obtidas das folhas de *P. cauliflora* e a determinação do teor de flavonóides totais foi realizada utilizando uma curva analítica estabelecida com soluções de concentração conhecida de quercetina. Os

resultados foram expressos, pela média de três determinações, em porcentagem da concentração de flavonóides totais frente à concentração inicial de leitura das amostras.

Foram diluídos 1 mg de quercetina em 2 mL de metanol (MeOH) 80% e desta solução, diferentes alíquotas foram adicionadas a 2 mL de solução de cloreto de alumínio hexahidratado 2% em metanol, completando o volume para 4 mL com metanol 80%, de forma que as concentrações de leitura foram de 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 e 4,00 µg/mL. As amostras vegetais foram preparadas a partir de uma solução da amostra em MeOH 80%, adicionando-se 2 mL destas soluções a 2 mL de solução de cloreto de alumínio hexahidratado 2% em metanol, sendo que a concentração final de leitura de cada amostra foi de 1 mg/mL. A leitura foi feita após 15 minutos de reação colorimétrica no escuro.

#### Perfil cromatográfico do extrato de folhas de *P. cauliflora*

O perfil cromatográfico do extrato EtOH 70 das folhas de *P. cauliflora* foi determinado a partir de uma alíquota de 10 mg da amostra liofilizada, que foi submetida a “clean up” em cartucho SEP Pak – RP18 (200 mg de adsorvente). Foram utilizados como eluente 1,5 mL da mistura de H<sub>2</sub>O/MeOH 2:8 (v/v), obtendo-se uma única solução.

A solução resultante foi filtrada em microfiltro de 0,22 µm para ser analisada por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodos (HPLC-UV-DAD). A composição da fase móvel variou em gradiente linear de acetonitrila (ACN) e água, ambas acidificadas com ácido trifluoracético (TFA) e a detecção foi feita por varredura de espectro de 200 a 400 nm. Inicialmente, foram registrados os cromatogramas de uma corrida inicial em que a composição da fase móvel variou de 5 a 100% de ACN. Em seguida, diante das informações obtidas, a condição cromatográfica final foi aperfeiçoada para análise do extrato, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Gradientes de eluição utilizados para determinação do perfil cromatográfico do extrato EtOH 70 das folhas de *P. cauliflora*.

Método	Solvente A	Solvente B	Gradiente			
			tempo (min)	% B	% A	vazão (mL/min)
Gradiente Inicial	H <sub>2</sub> O + 0,05% TFA	ACN + 0,05% TFA	0	5	95	1
			50	100	0	1
Método Otimizado	H <sub>2</sub> O + 0,05% TFA	ACN + 0,05% TFA	0	4	93	1
			20	25	77	1
			30	30	72	1
			40	40	50	1
			60	100	10	1

#### Purificação do extrato de *P. cauliflora*

##### Cromatografia em coluna

Uma amostra da FrAcOEt correspondente a 2,5 g foi solubilizada em 10 mL de MeOH e centrifugada por 15 min a 2500 rpm. O sobrenadante foi submetido a cromatografia de permeação em gel, aplicando-o em uma coluna de vidro de 72,0 x 2,5 cm (d.i.) a qual continha Sephadex LH-20 como fase estacionária (SEVERI et al., 2010). A fase móvel utilizada foi MeOH e esta bombeada na coluna por meio de bomba peristáltica a um fluxo de 1,0 mL/min. Frações com aproximadamente 8 mL foram coletadas em tubos de ensaio por um coletor automático, obtendo-se o total de 241 subfrações. Estas foram analisadas por CCD em fase estacionária de placa de sílica gel 60 F<sub>250</sub>, fase móvel clorofórmio:metanol (90:10; v/v) e outra fase móvel clorofórmio:metanol:*n*-propanol:água (5:6:1:4; v/v), fase orgânica, sendo reunidas conforme similaridade de R<sub>f</sub>s e colorações diante do revelador anisaldeído sulfúrico,

após aquecimento e visualizado sob luz UV (SEVERI et al., 2010). Foram utilizados os padrões rutina e ácido gálico na CCD. As subfrações #201-205, #208-210 e #217-226 foram secas, dissolvidas em DMSO deuterado ( $d_6$ ) e analisadas por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ).

#### Cromatografia em contra-corrente de alta velocidade

Primeiramente foi realizada a otimização do sistema de solventes para a separação por cromatografia em contra-corrente de alta velocidade (HSCCC) da FrBuOH por meio de análises em CCD (SILVA et al., 2007). Uma alíquota da FrBuOH foi diluída em misturas sistemas solventes formados por Hex/AcOEt/MeOH/BuOH/H<sub>2</sub>O de várias proporções, como pode ser observado na Tabela 3. Os tubos foram colocados em banho ultrassônico por 10 minutos e, em seguida, as fases foram separadas em centrífuga. As fases orgânica e aquosa de cada um dos tubos foram aplicadas em placas cromatográficas, eluídas com clorofórmio:metanol:*n*-propanol:água (5:6:1:4; v/v; fase orgânica) e reveladas com anisaldeído sulfúrico, aquecimento e visualização sob luz UV. A partir deste processo de otimização, o sistema de solventes que forneceu o coeficiente de partição mais próximo a 1 para a FrBuOH foi o de número VIII, segundo a Tabela 3.

Tabela 3: Proporção dos solventes utilizados na otimização do sistema solvente para HSCCC de FrBuOH.

Sistema	Hex	AcOEt	MeOH	BuOH	H <sub>2</sub> O
I	1	5	1	-	5
II	1	2	0,8	-	1,5
III	-	1	-	-	1
IV	-	-	-	1	1
V	-	1	-	1	1
VI	-	4	-	1	5
VII	-	3	-	2	5
VIII	-	3,8	-	1,2	5
IX	-	3,5	-	1,5	5
X	-	3	-	2	5

Uma amostra da FrBuOH de 1,25 g foi dissolvida em 15 mL da fase orgânica do sistema solvente VIII, colocada em banho ultrassônico por 10 minutos e, em seguida, centrifugada a 2500 rpm. A fase estacionária utilizada no cromatógrafo foi a aquosa e a fase móvel foi a fase orgânica do sistema VIII, utilizadas após 12 h de contato entre as ambas. O equilíbrio da coluna do cromatógrafo foi obtido posteriormente à saída de cerca de 55 mL da fase estacionária. O sobrenadante da amostra centrifugada foi aplicado pelo módulo de injeção. A velocidade foi ajustada a 850 rpm e o fluxo foi de 1,5 mL/min. Foram coletadas 130 subfrações de cerca de 4 mL cada que foram analisadas por CCD, eluídas com mistura de clorofórmio:metanol:*n*-propanol:água (5:6:1:4; v/v), fase orgânica, e reveladas com anisaldeído sulfúrico, aquecimento e visualização sob luz UV. As subfrações com similaridades de cor e R<sub>f</sub> foram reunidas.

A fração #49-52 (100 mg), obtida por HSCCC, foi dissolvida em metanol, filtrada em microfiltro de 0,45 µm e purificada por HPLC-UV-DAD em gradiente de eluição formado pelos solventes A (H<sub>2</sub>O + 0,05% TFA) e B (MeOH + 0,05% TFA), de acordo com a rampa: 20% de B em A em 15 min, de 20-50% de B até 35 min e 50-100% de B até 40 min, com fluxo de 2 mL/min e monitoramento em 254 nm. Com este

sistema foram coletadas três sub-frações: 1, 2 e 3. Após análise por CCD, a fração 2 apresentou a maior pureza e foi analisada por RMN e Espectrometria de Massas.

#### Cromatografia líquida de média eficiência

Uma amostra da FrAq correspondente a 500 mg foi solubilizada em 2 mL de MeOH e centrifugada por 15 min a 2500 rpm. O sobrenadante foi submetido a cromatografia em coluna, aplicando-o em uma coluna de vidro de 17,5 x 1,5 cm (d.i.) a qual continha sílica gel 60H como fase estacionária. A fase móvel utilizada foi um gradiente de eluição metanol:água de 0 a 100% de metanol, bombeada na coluna por meio de bomba peristáltica a um fluxo de 1,0 mL/min gerando diferentes subfrações. Estas foram analisadas por CCD em fase estacionária de placa de sílica gel 60 F<sub>250</sub>, fase móvel clorofórmio:metanol:*n*-propanol:água (5:6:1:4; v/v), fase orgânica, sendo reunidas conforme similaridade de R<sub>f</sub>s e colorações diante do revelador anisaldeído sulfúrico, após aquecimento e visualizado sob luz UV. Foram utilizados os padrões rutina e ácido gálico na CCD.

A Figura 8 mostra em resumo os estudos químicos realizados com o extrato ETOH 70 das folhas de *P. cauliflora*.



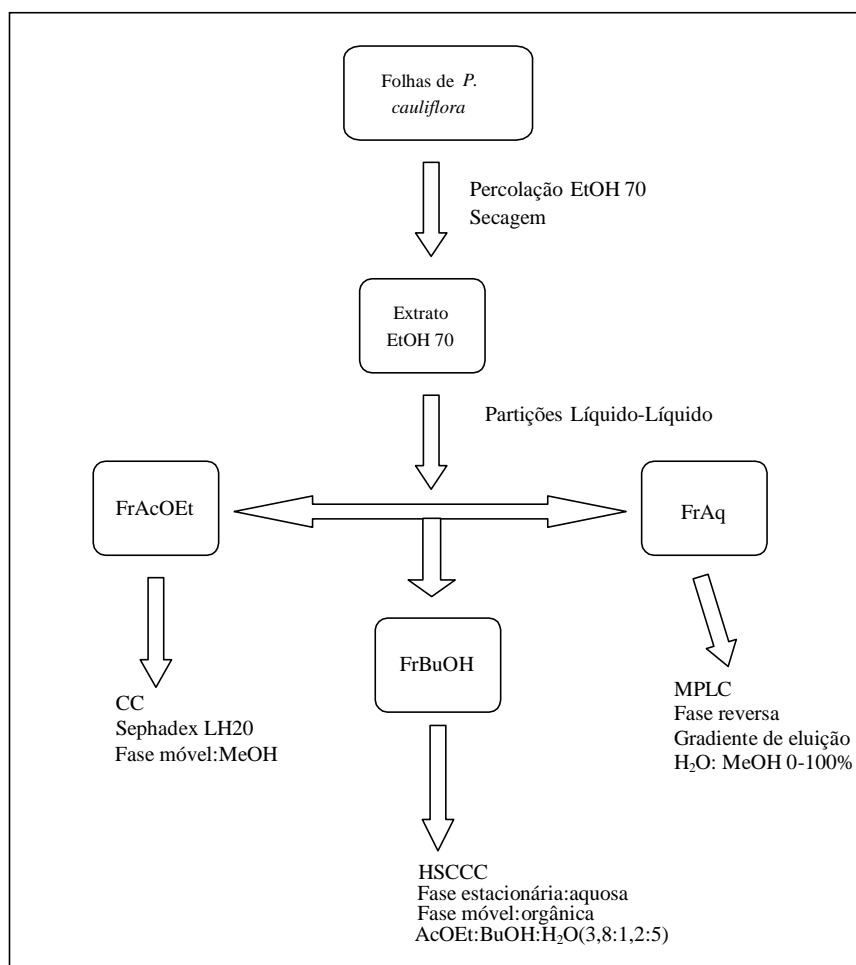


Figura 8: Esquemas dos estudos químicos realizados com as folhas de *P. cauliflora*.

### 3.2.2. Avaliação da atividade antifúngica

#### Preparo dos antifúngicos

Os antifúngicos anfotericina B e fluconazol foram usados como controle positivo para as cepas de *Candida* sp. Foram dissolvidos 16 mg de anfotericina B em 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e mantida como solução estoque. Para teste, foram feitas duas diluições 1:5 (v/v) em meio de cultura, de forma que a concentração fosse 64 µg/mL. A solução estoque de fluconazol consistiu da dissolução de 25,6 mg em 10 mL de água destilada e para aplicação no teste foi feita uma diluição 1:10 (v/v) em meio de cultura para que a concentração fosse de 256 µg/mL.

### Preparo das amostras

O óleo essencial de *M. alternifolia* foi diluído a 4% (p/v) em uma solução aquosa 1% de Tween 80, a fim de aumentar sua solubilidade no meio de cultura (PACKER e LUZ, 2007). Desta solução estoque, foram aplicados 50 µL no poço de “template” para o teste de avaliação da atividade antimicrobiana por difusão em ágar e 100 µL na microplaca para determinação da concentração inibitória mínima.

Para o teste de difusão em ágar, foram dissolvidos 100 mg do extrato, da FrAcOEt, FrBuOH e FrAq em 1 mL de DMSO e aplicados nos poços do “template” 100 µL da solução diluída 1:2 (v/v) em meio de cultura. Para o teste de determinação da concentração inibitória, 50 mg do extrato, da FrAcOEt, FrBuOH e FrAq foram dissolvidos em 1 mL de DMSO e foram aplicados 100 µL de cada uma das soluções diluídas 1:10 em meio de cultura nos poços da microplaca, separadamente.

Para o teste de determinação da concentração inibitória mínima também foram ensaiadas subfrações obtidas por CC, HSCCC e MPLC, dissolvidas em DMSO e diluídas 1:10 (v/v) ou dissolvidas diretamente em meio de cultura, aplicando-se 100 µL, separadamente, em poços da microplaca. A faixa de concentração das amostras aplicadas nos testes está apresentada na Tabela 4.

Tabela 4: Faixa de concentração das amostras para a avaliação da atividade antimicrobiana.

Amostras	Difusão em ágar	CIM e CFM	
		Máxima	Mínima
Óleo essencial de <i>M. alternifolia</i>	4%	1%	0,002%
Extrato de <i>P. cauliflora</i>	5 mg/mL	1250 µg/mL	2,40 µg/mL
FrAcOEt	5 mg/mL	1250 µg/mL	2,40 µg/mL
Subfr #54-98	-	1250 µg/mL	2,40 µg/mL
Subfr #99-241	-	1250 µg/mL	2,40 µg/mL
Subfr#119	-	250 µg/mL	0,49 µg/mL
Subfr#139-148	-	200 µg/mL	0,39 µg/mL
Subfr#183-185	-	50 µg/mL	0,10 µg/mL
Subfr#187-188	-	950 µg/mL	1,85 µg/mL
Subfr#189-192	-	2750 µg/mL	5,4 µg/mL
Subfr#193-196	-	150 µg/mL	0,29 µg/mL
Quercetinas	-	500 µg/mL	0,98 µg/mL
Subfr#206-207	-	600 µg/mL	1,17 µg/mL
miricetina-alopiranosídeo	-	500 µg/mL	0,98 µg/mL
miricetina-galactopiranosídeo	-	500 µg/mL	0,98 µg/mL
FrBuOH	5 mg/mL	1250 µg/mL	2,40 µg/mL
Subfr #35-48	-	1250 µg/mL	2,40 µg/mL
Subfr #49-52	-	1000 µg/mL	2,00 µg/mL
Subfr #1	-	630 µg/mL	1,23 µg/mL
Casuarinina	-	580 µg/mL	1,13 µg/mL
Subfr #3	-	610 µg/mL	1,19 µg/mL
Subfr #61-65	-	300 µg/mL	0,60 µg/mL
Subfr#114-122	-	1250 µg/mL	2,40 µg/mL
FrAq	5 mg/mL	1250 µg/mL	2,40 µg/mL
Subfr #1	-	1250 µg/mL	2,40 µg/mL
Subfr #7-9	-	1110 µg/mL	2,2 µg/mL
Subfr #12-18	-	1000 µg/mL	2,0 µg/mL
anfotericina B	64 µg/mL	16 µg/mL	0,03 µg/mL
Fluconazol	-	64 µg/mL	0,06 µg/mL

Os controles negativos foram realizados com os sistemas solventes utilizados DMSO:RPMI 1640 (1:5; v/v) e solução 1% de Tween 80 adicionada de 4% de meio de cultura.

#### Preparo da suspensão de levedura

Cinco colônias com diâmetro de cerca de 1 mm, de cultura de 24 h a 35 °C, foram suspensas em 5,0 mL de solução salina 0,9% esterilizada. A suspensão foi agitada em vórtex por 15 segundos e ajustada para obtenção de suspensão de turvação na escala 0,5 de McFarland, relativa a  $1.10^6$  a  $5.10^6$  leveduras/mL em salina, com auxílio de contagem do número de células em câmara de Neubauer. Para o teste de difusão em ágar, foram aplicados 100 µL dessa suspensão sobre o meio de cultura sólido na placa, dispersando com alça de Drigalsky. Para a determinação de CIM, a suspensão foi novamente diluída para ser utilizada no ensaio a concentração de  $5.10^2$  a  $2,5.10^3$  leveduras/mL.

#### Teste de difusão em ágar

O teste foi realizado em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio ágar-Müeller Hinton acrescido de 2% de *d*-glicose e 0,5 µg/mL de azul de metileno, de acordo com a Norma M44-A2 de 2009 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009) com adaptações descritas na metodologia. A aplicação das amostras foi feita individualmente nos poços de 6 mm de diâmetro interno de moldes de aço denominados “templates”. Antes de incubadas a 35 °C por 48 h, as placas foram deixadas 1 h a 4 °C para permitir a difusão das amostras (SOUZA et al., 2010). Foram adicionados 50 µL de anfotericina B (64 µg/mL) como controle de inibição do crescimento das leveduras. A atividade antimicrobiana das amostras foi verificada pela medida do halo de inibição de crescimento e comparada com o halo formado pelo controle. Os testes foram feitos em triplicata.

### Determinação da concentração inibitória mínima e da concentração fungicida mínima

O ensaio de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente a leveduras do gênero *Candida* foi realizado utilizando a metodologia de diluição em microplaca, segundo a Norma M27-A2 de 2002 do CLSI (anteriormente denominado National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS), modificada como segue.

O meio de cultura em caldo preconizado para ser utilizado para cultivo de *Candida sp.* é o RPMI-1640 contendo glutamina e vermelho de fenol, mas sem bicarbonato, suplementado de ácido 3-[N-morfino] propanosulfônico (MOPS) na concentração de 0,165 mol/L, com pH 7,0 e esterilizado por filtração, enquanto que o meio sólido apropriado é o ágar-Sabouraud.

Após a adição de 100 µL de RPMI 1640 a todos os poços, foram transferidos 100 µL da solução estoque preparada do óleo essencial, das soluções diluídas do extrato das folhas de *P. cauliflora*, das frações FrAcOEt, FrBuOH, FrAq e das subfrações citadas para o primeiro poço de cada linha de microplacas. Também foram transferidos 100 µL da solução de controle positivo de anfotericina B e das soluções diluídas de controle negativo de DMSO e da solução 1% de Tween 80. Diluições seriadas de 100 µL foram realizadas (TEMPONE et al., 2008) e em seguida foram adicionados 100 µL da suspensão de levedura previamente preparada a todos os poços da microplaca (exceto naqueles destinados ao controle de esterilidade do meio) de forma que a concentração de células foi de  $2,5 \cdot 10^3$  leveduras/mL. As concentrações das amostras variaram de 1:1 a partir da maior até a menor concentração, como apresentado na Tabela 4. A Figura 9 mostra um esquema da diluição seriada em microplaca. As microplacas foram incubadas por 48 h a 35 °C sob agitação constante a 150 rpm. O crescimento fúngico foi evidenciado pela alteração da cor do meio de cultura de rosa para amarelo e concentração inibitória mínima foi determinada como a menor concentração de cada amostra que inibiu o crescimento fúngico.

Foi realizada uma sub-cultura de cada microplaca utilizando meio ágar Sabouraud em placa de Petri de 12 cm diâmetro para determinação da concentração fungicida mínima. As placas foram incubadas por 48 h a 35 °C. A concentração fungicida mínima foi então observada pela ausência ou presença de crescimento da levedura (HAWSER e ISLAM, 1999). Os testes foram realizados em triplicata.

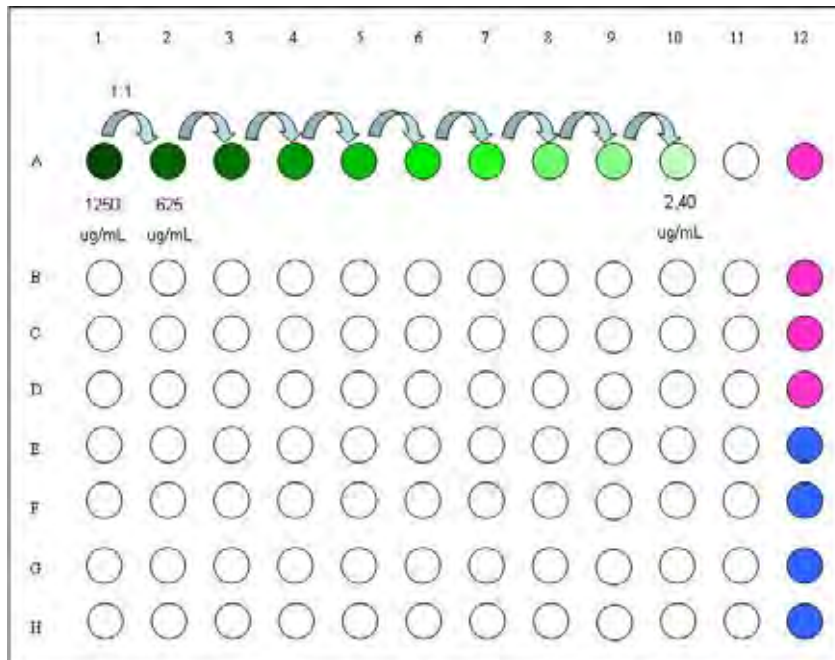


Figura 9: Esquema de diluição seriada em microplaca para o extrato e as frações de *P. cauliflora*.

Após obtenção e purificação da fração mais ativa foram obtidas três sub-frações com as quais foi avaliado o sinergismo entre si e entre cada uma delas com a fração ativa. Na mesma microplaca foi aplicada uma das amostras em ordem decrescente de concentração no sentido de 1 a 11 e outra amostra, em concentração decrescente de A a H, de forma a que todas as concentrações testadas de ambas as amostras tivessem contato. Procedeu-se à incubação da cepa de *C. albicans* como descrito na metodologia de determinação de concentração inibitória mínima, com volume total de 200  $\mu$ L. O sinergismo foi avaliado de acordo com índice de inibição fracional (ODDS, 2003).

### 3.2.3. Efeitos sobre a curva de morte

Previamente, as leveduras foram incubadas por 48 h a 35 °C em Sabouraud caldo. O inóculo foi ajustado em salina para a que suspensão inicial do teste fosse de  $1.10^5$  células/mL. As amostras vegetais foram adicionadas nos valores de CIM para a FrBuOH e fluconazol e  $\frac{1}{2}$ CIM para o óleo essencial, incubando a 35 °C também as células que não receberam nenhuma amostra. Nos períodos de incubação de 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h e 24 h foram coletados 50 µL de suspensão, diluídos de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  em salina tamponada pH 7,3 (PBS) e estriados em placas de Petri contendo Sabouraud ágar, que foram incubadas por 48 h a 35 °C. A média do número de colônias obtidas foi comparada com a média do número colônias obtidas para as células que não receberam nenhum tratamento. O teste foi realizado em triplicata e o resultado foi expresso em UFC/mL (SOUZA et al., 2007).

### 3.2.4. Avaliação da citotoxicidade

As células de fibroblastos foram mantidas em garrafas de cultura incubadas em estufa a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em meio Eagle (pH 7) suplementado com 50% de meio Leibovitz L-15, 10% de soro bovino fetal e 0,2% de bicarbonato de sódio.

#### Preparo das amostras

O óleo essencial de *M. alternifolia* foi diluído a 15% em uma solução aquosa 1% de Tween 80. Desta solução estoque, foram aplicados 50 µL em 150 µL de meio na microplaca, para posterior diluição seriada 1:1 nos demais poços da mesma linha. Do extrato, da FrAcOEt, FrBuOH e FrAq foram dissolvidos 100 mg em 1 mL de DMSO, diluídos 1:5 com meio de cultura e 20 µL foram aplicados em 180 µL de meio e diluídos de forma seriada na proporção 1:1. Também foram analisadas as subfrações da FrAcOEt: #201-205, #208-210, #217-226 e da FrBuOH #49-52: 1, 2 e 3. A faixa de concentração de teste de cada amostra está apresentada na Tabela 5.

Tabela 5: Faixa de concentração das amostras para a avaliação da citotoxicidade.

Amostras	Máxima	Mínima
Óleo essencial de <i>M. alternifolia</i>	3,75%	0,004%
Extrato de <i>P. cauliflora</i>	2000 µg/mL	3,9 µg/mL
FrAcOEt	2000 µg/mL	3,9 µg/mL
quercetinas	200 µg/mL	0,39 µg/mL
miricetina-alopiranosídeo	200 µg/mL	0,39 µg/mL
miricetina-galactopiranosídeo	200 µg/mL	0,39 µg/mL
FrBuOH	2000 µg/mL	3,9 µg/mL
Subfr #49-52	400 µg/mL	0,78 µg/mL
Subfr #1	126 µg/mL	0,25 µg/mL
casuarinina	116 µg/mL	0,23 µg/mL
Subfr #3	122 µg/mL	0,24 µg/mL
FrAq	2000 µg/mL	3,9 µg/mL

### Procedimento

A técnica consistiu em coletar as células por tripsinização (solução tripsina 0,25%–EDTA 0,53 mM), centrifugá-las a 1500 rpm por 10 minutos e contá-las em câmara de Neubauer, ajustando para a concentração de  $1.10^5$  células/mL em meio de cultura. As células foram incubadas em microplacas de 96 poços, a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 72 h. Após este período, foi observada a formação de tapete celular e foi retirado o meio existente, já inadequado para a manutenção. Em outra microplaca de 96 poços foram colocados 100 µL de meio em todos os poços, exceto nos primeiros poços da coluna 1, que recebeu 150 µL de meio e 50 µL da solução estoque do óleo essencial em uma das linhas e 180 µL de meio de cultura e 20 µL das demais amostras diluídas nas outras linhas. Foi então realizada uma diluição seriada 1:1 (v/v) a partir destes poços com 200 µL para os demais poços da respectiva microplaca. As amostras assim diluídas foram transferidas para a microplaca contendo o tapete celular e esta foi incubada por 24 h a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> (OHNO et al., 1998; TAKAHASHI et al., 2008). Posteriormente, foram adicionados 15 µL de solução aquosa de resazurina a



0,1 mg/mL, incubando a microplaca por 3 h na mesma estufa. Quatro poços da coluna 12 foram utilizados para controle positivo do crescimento celular e quatro como controle negativo de ausência de crescimento. A leitura dos resultados foi feita por meio do leitor de fluorescência Spectra Fluor Plus – Tecan, com filtros de luz de 530 e 590 nm e programa de análise Magellin (O'BRIEN et al., 2000).

### 3.2.5. Efeitos sobre a morfologia

Este teste foi aplicado, primeiramente, à cepa de *C. tropicalis*, baseado no trabalho de Hawser et al. (1996) com as modificações descritas a seguir. Foi feito ajuste da concentração de células para a escala 0,5 de McFarland a partir de uma cultura em RPMI-1640 de 48 h a 35 °C. Em diferentes tubos de ensaio, adicionou-se uma concentração  $\frac{1}{2}$  CIM de anfotericina B e a concentração de CIM do óleo essencial e da FrBuOH junto ao meio RPMI-1640 com 20% de soro bovino fetal para indução da formação de hifa. Nestas soluções a levedura foi colocada de forma a atingir  $2,5 \cdot 10^3$  células/mL, incubando os tubos a 35 °C. A primeira leitura foi realizada após 24 h de incubação, diluindo a amostra 1:10 em PBS e contando a quantidade de células leveduriformes, tubos germinativos, pseudo-hifas e hifas em câmara de Neubauer. O mesmo procedimento de leitura foi realizado após 48 h de incubação, com alteração da diluição de leitura para 1:100.

Paralelamente, amostras de 24 e 48 h foram coradas com Calcofluor White (metodologia descrita no item de Microscopia de fluorescência) para comparação de alteração de quitina da parede celular das espécies tratadas comparadas com as não tratadas.

No “Institute of Medical Sciences” foram avaliados os efeitos sobre a morfologia de *C. albicans* SC5314. Uma colônia foi inoculada em 5 mL de meio YPD (“yeast extract, peptone and dextrose medium”) por 16 h, 30 °C, 200 rpm. Foi coletado 1 mL, centrifugado (5 min, 3000 rpm) e lavado 2x com água tipo I esterilizada. A leitura de densidade óptica (DO) foi feita a 600 nm, inoculando OD=0,1 de células em 5 mL de água esterilizada adicionada de 20% de soro bovino fetal e em meio de cultura definido de Lee (pH 6,5) (LEE et al., 1975; BRAUN e

JOHNSON, 1997). Em cada frasco foi adicionada, separadamente, a solução de óleo essencial a 0,25%, a 0,03% e a solução estoque diluída da sub-fração #49-52 a 156 µg/mL. Ao controle não foi adicionada nenhuma amostra antifúngica. Após 3 h a 37 °C e 200 rpm, foi coletado e centrifugado 1 mL de cada frasco. As células foram fixadas com 300 µL de formalina a 10% (v/v) tamponada, 2,5 µL foram colocados sobre a lâmina poli-L-lisina e 50 µL de Calcofluor White 25 µg/mL foram adicionados para visualização de formação de hifas e de alteração de quitina (WALKER et al., 2008). As imagens e as medidas do comprimento do filamento da célula em forma de hifa foram realizadas por meio do programa Openlab 4.0.4.

### 3.2.6. Efeitos sobre ergosterol

#### Ligação a ergosterol exógeno

Esta metodologia foi desenvolvida da mesma forma que a determinação de CIM pela Norma M27-A2, entretanto, com adição de 200 µg/mL de ergosterol comercial dissolvido em dimetilformamida e diluído em meio de cultura de forma que a concentração final do solvente fosse de 0,1%. Foram testados o óleo essencial de *M. alternifolia* e os controles fluconazol e anfotericina B nas mesmas concentrações utilizadas para determinação de CIM e o extrato das folhas de *P. cauliflora*, FrAcOEt, FrBuOH, FrAq e subFr #49-52 em concentração 4x maior. A incubação das microplacas foi de 48 h a 35 °C, sem agitação (LEE et al., 1999). A concentração inibitória mínima foi determinada visivelmente pela ausência de turvação e pela manutenção da coloração rósea do meio de cultura (devido ao indicador vermelho de metila da formulação, que se torna amarelo em pH ácido produzido pelo metabolismo dos micro-organismos presentes).

Foi realizada uma sub-cultura de cada microplaca utilizando meio ágar Sabouraud em placa de Petri de 12 cm diâmetro para determinação da concentração fungicida mínima. As placas foram incubadas por 48 h a 35 °C. A concentração fungicida mínima foi então observada pela ausência ou presença de crescimento da levedura. Os testes foram realizados em triplicata.

### Quantificação do ergosterol

A quantificação de ergosterol foi realizada pelo método de Arthington-Skaggs et al. (2002). As células das quatro espécies de *Candida* foram incubadas em caldo Sabouraud por 18 h e utilizadas na concentração de  $2,5 \cdot 10^3$  leveduras/mL para inocular erlenmeyers contendo 20 mL de Sabouraud e, separadamente, as amostras de óleo essencial, FrBuOH e fluconazol em concentrações descritas na Tabela 6. Controles foram realizados com o inóculo das diferentes cepas sem adição de nenhuma amostra. Os erlenmeyers foram incubados por um período de aproximadamente 18 h a 35 °C sob agitação de 150 rpm.

Tabela 6: Concentração das amostras vegetais e antifúngico para o ensaio de quantificação de ergosterol.

Amostras	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>
Óleo essencial	0,06%	0,12%	0,06%	0,06%
FrBuOH	78 µg/mL	19 µg/mL	19 µg/mL	156 µg/mL
Fluconazol	4,0 µg/mL	16 µg/mL	4,0 µg/mL	64 µg/mL

Posteriormente, as culturas foram colocadas em tubos de centrífuga, centrifugadas a 300 rpm por 5 min e lavadas com água destilada. Determinou-se o peso do precipitado e então adicionou-se 3 mL de solução de KOH a 25% (25% KOH, 35% água destilada e volume completo para 100% com etanol), agitando em vórtex por 1 min para saponificação da membrana celular. As suspensões foram transferidas para tubos estéreis de boro-silicato com tampa e colocadas em banho-maria por 1 h a 90 °C. Após resfriamento a temperatura ambiente, os esteróis foram extraídos com a adição de 1 mL de água estéril e 3 mL de hexano e agitação em vórtex por 3 min.

A mistura foi deixada em repouso por 72 h a -20 °C para separação da camada de hexano, realizando-se a leitura com uma solução 1:5 da camada hexânica em etanol, utilizando espectrofotômetro e cubetas de quartzo de 1 cm na faixa de comprimento de onda de 300 a 220 nm.

A presença de ergosterol e do seu último intermediário, 24(28) dihidroergosterol (24(28)DHE) foi verificada por uma curva característica de quatro picos e a ausência, por uma linha reta (ARTHINGTON-SKAGGS et al., 2002).

O conteúdo de ergosterol foi calculado como porcentagem em relação ao peso do precipitado (pellet), de acordo com as equações:

$$(1) \%ergosterol + \%24(28)DHE = \frac{\left[ \left( \frac{A_{281,5}}{290} \right) \cdot F \right]}{pesopellet}$$

$$(2) \%24(28)DHE = \frac{\left[ \left( \frac{A_{230}}{518} \right) \cdot F \right]}{pesopellet}$$

$$(3) \%ergosterol = (1) - (2)$$

Onde,

F = fator de diluição em etanol.

290 = valor  $\epsilon$ , em porcentagem por cm, determinado para o ergosterol cristalino.

518 = valor  $\epsilon$ , em porcentagem por cm, determinado para o 24(28)DHE cristalino.

### 3.2.7. Efeitos sobre a parede celular

#### Efeito de proteção do sorbitol

Esta metodologia foi desenvolvida de acordo com a determinação de CIM pela Norma M27-A2, entretanto, com adição de 0,8 M de sorbitol. Foram testados o óleo essencial de *M. alternifolia*, os controles fluconazol e anfotericina B nas mesmas concentrações utilizadas para determinação de CIM, o extrato das folhas de *P. cauliflora*, FrAcOEt, FrBuOH, FrAq e subFr #49-52 em concentração 4x maior. A incubação das microplacas foi de 48 h a 35 °C, sem agitação (ESCALANTE et al., 2008). A concentração inibitória mínima foi determinada visivelmente pela ausência de turvação e pela manutenção da coloração rósea do meio de cultura.

Foi realizada uma sub-cultura de cada microplaca utilizando meio ágar Sabouraud em placa de Petri de 12 cm diâmetro para determinação da concentração fungicida mínima. As placas foram incubadas por 48 h a 35 °C. A concentração fungicida mínima foi então observada pela ausência ou presença de crescimento da levedura. Os testes foram realizados em triplicata.

### Microscopia de fluorescência

As amostras para esta microscopia foram obtidas a partir de microplacas preparadas de forma semelhante à determinação de CIM com as cepas de levedura em estudo sem tratamento e tratadas com o óleo essencial, a subFr #49-52 e a subFr P2. As leituras foram feitas com 24 e 48 h e a concentração das amostras vegetais está apresentada na Tabela 7. Em cada leitura, os 200 µL do respectivo poço foram transferidos para microtubo, centrifugados a 13000 rpm por 1 min e lavados 2 vezes com solução aquosa de EDTA 30 mM. Adicionou-se 50 µL de solução de Calcofluor White 25 µg/mL e após 1 h as imagens das cepas controle e tratadas foram feitas em microscópio de fluorescência (CLARO et al., 2007).

Tabela 7: Concentração das amostras vegetais incubadas com as espécies de *Candida* para o ensaio com Calcofluor White.

Amostras	<i>C. albicans</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. tropicalis</i>	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Óleo essencial	0,06%	0,12%	0,03%	0,12%	0,03%	0,06%	0,007%	0,015%
subFr#49-52	156	312	2,4	9,8	2,4	9,8	19	39
	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
subFr2	36	72	2,3	9,0	2,3	4,6	18	36
	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL

Também foi realizada microscopia de fluorescência com o óleo essencial (0,03%) e com a sub-fração #49-52 (156 µg/mL) frente à cepa *C. albicans* SC5314 a partir de culturas realizadas em microplaca para determinação de CIM, na Universidade de Aberdeen. Após 24 h a 37 °C, tomou-se 200 µL do respectivo poço na microplaca correspondente ao controle de células sem tratamento, com o óleo

essencial e com a sub-fração, colocando em um microtubo para centrifugação a 13000 rpm, 30 segundos e adicionando 500 µL de solução de formalina a 10% (v/v) tamponada. Foram misturados 2,5 µL dessa solução com 50 µL da solução de Calcofluor White sobre a lâmina de poli-L-lisina, que depois de secos foram observados com fluorescência sob microscopia de contraste de fase por interferência diferencial e as imagens foram analisadas por meio do programa Openlab 4.0.4 (WALKER et al., 2008).

#### Microscopia eletrônica de varredura

Após crescimento por 24 h a 35 °C em caldo Sabouraud, as quatro cepas de *Candida*, correspondendo a  $2,5 \cdot 10^3$  células/mL, foram estriadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud e incubadas por 12 h a 35 °C. Em seguida, foram adicionados 500 µL de solução do óleo essencial a 0,25% para *C. albicans* e *C. krusei*, 0,125% para *C. parapsilosis* e 0,06% para *C. tropicalis*, sendo que da FrBuOH foram adicionados 78 µg/mL para *C. albicans*, 19 µg/mL para *C. krusei* e *C. parapsilosis* e 156 µg/mL para *C. tropicalis*, incubando as placas por mais 24 h a 35 °C. Uma placa de cada espécie foi deixada como controle, não recebendo nenhum tratamento e ficando incubada por 36 h.

Finalizado o tempo de incubação, uma colônia de cada placa foi retirada, colocada em microtubo com 500 µL de PBS, agitada em vórtex por 2 min, centrifugada a 13000 rpm por 1 min e lavada duas vezes. Foram colocados 200 µL de solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato pH 7,1 nos microtubos e deixados em repouso por 20 min. As amostras foram centrifugadas novamente e lavadas três vezes. O excesso de sobrenadante foi descartado e uma alíquota de 5 µL de cada amostra foi aplicada sobre a superfície de lamínulas, deixando secar por 24 h a 37 °C. As lamínulas foram cobertas com ouro e examinadas no microscópio eletrônico de varredura a 10 kV (SANGETHA et al., 2009).

### Microscopia eletrônica de transmissão

O preparo das amostras a serem examinadas e a microscopia eletrônica de varredura foram realizadas no “Institute of Medical Sciences”, Aberdeen. A partir de uma cultura de 16 h a 30 °C e 200 rpm em YPD, foi inoculada uma OD < 0,2 de células em 50 mL de YPD. Os diferentes frascos foram separados em controle sem tratamento, tratamento com 0,03% de óleo essencial e 156 µg/mL da subFr #49-52, incubados a 30 °C, por 16 h e 200 rpm. As células foram filtradas sob vácuo em membrana de 0,22 µm, recolhendo-se amostras para congelamento em nitrogênio líquido sob alta pressão. A solificação do material congelado foi feita em sistema de temperatura controlada em acetona seca contendo 1% de OsO<sub>4</sub> por 48 h a -90 °C. As amostras foram gradualmente aquecidas a -30 °C para finalização em acetona: resina (1:2) sendo, posteriormente, embebidas em resina de epóxido em um TAAB812. Secções ultrafinas de 60 nm foram feitas e coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo. A visualização foi feita em microscópio eletrônico de varredura com auxílio de câmera digital Gatan Bioscan (NETEA et al., 2006).

### Quantificação dos açúcares da parede celular

#### Extração da parede celular

Os procedimentos de extração e quantificação dos polissacarídeos da parede celular de *C. albicans* SC5314 foram executados no “Institute of Medical Sciences”. Uma colônia da levedura foi inoculada em YPD por 16 horas a 30 °C, 200 rpm. Desta cultura foi adicionado 1 mL a 100 mL de YPD (OD < 0,2), em diferentes frascos acrescidos, respectivamente, de 0,03% de óleo essencial de *M. alternifolia* e de 156 µg/mL da subFr#49-52. Um controle sem tratamento foi realizado em outro frasco. Os frascos foram colocados sob 200 rpm de agitação, 30 °C, 16 h, para crescimento das células leveduriformes.

Paralelamente, a partir de uma colônia inoculada em YPD por 16 horas a 30 °C, 200 rpm as células foram lavadas duas vezes e inoculadas em concentração menor que  $2 \times 10^7$ /mL em 200 mL de água tipo I esterilizada acrescida de 20% de soro

bovino fetal por 16 h, 37 °C e 200 rpm. Esta incubação foi realizada para avaliar a composição da parede celular da forma hifal das células tratadas com as amostras vegetais na mesma concentração utilizada para o crescimento de leveduras (também sendo realizada com 0,12% do óleo essencial).

As células foram então centrifugadas a 3000 rpm, 5 min, 4 °C. Os precipitados foram ressuspensos em 20 mL de tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,5 a 4 °C, esterilizado, sendo novamente centrifugados e ressuspensos em 2 mL do tampão para serem divididos em microtubos de centrífuga com tampa de rosca (“screw cap microtubes”), centrifugados a 7000 rpm, 1 min, 4 °C e agora ressuspensos em 200 µL do tampão Tris-HCl. Foi adicionada quantidade suficiente de “glass beads” refrigeradas lavadas com ácido e solução completa de inibidor de protease em tampão Tris-HCl com solução etanólica de fluoreto de fenilmetilsulfonato (PMSF) 100 mM para lise das células de levedura em mini-BeadBeater em 6 ciclos de 30 segundos de quebra e 1 min no gelo. Os conteúdos com o mesmo tratamento foram reunidos com auxílio de solução de NaCl 1 M a 4 °C, separados das “glass beads” e lavados por 6 vezes com 40 mL da referida solução a 3000 rpm, 5 min, 4 °C. Posteriormente, os precipitados foram lavados por 2 vezes com água tipo I e o peso úmido foi conferido para adição de 0,5 mL de tampão dodecilsulfato de sódio (SDS) com β-mercaptoetanol por 100 mg. A suspensão foi colocada em água fervente por 10 min, refrigerada sob temperatura ambiente, centrifugada a 3000 rpm, 5 min, temperatura ambiente e repetiu-se mais uma vez o processo de fervura com tampão SDS e β-mercaptoetanol. O volume foi levado a 14 mL com água do tipo MilliQ para centrifugação a 3000 rpm, 5 min, temperatura ambiente. Procedeu-se ao processo de lavagem com água tipo I refrigerada a 3000 rpm, 5 min, 4 °C até eliminação do SDS (verificado por ausência de espuma). O precipitado final, contendo apenas a parede celular, foi congelado em nitrogênio líquido e seco por “freeze-drier” (GROOT et al., 2004).

#### Hidrólise dos polímeros de açúcares

Foi pesada, em microtubo, uma quantidade menor que 3 mg das amostras de parede celular secas e adicionados 500 µL de ácido trifluoroacético 2 M. Com a tampa



fechada, os microtubos foram colocados em blocos de aquecimento a 100 °C por 3 h, resfriados a temperatura ambiente e colocados abertos a 75 °C por 30 min para evaporação completa do ácido. Foi adicionado 1 mL de água, deixando evaporar por 18 h a 70 °C. Repetiu-se este processo mais uma vez. Posteriormente, as amostras secas com os monômeros de açúcares dos polímeros hidrolisados da parede celular foram dissolvidas em água (100 µL para cada 1 mg da massa seca anteriormente pesada), centrifugadas a 13000 rpm por 10 min e diluídas 1:20 em água para separação de glicose, glicosamina e manose por cromatografia líquida de alta eficiência com troca aniônica utilizando sistema eluente isocrático de 100% de NaOH 200 mM por 20 min e fluxo de 0,5 mL/min (MORA-MONTES et al., 2007).

#### Quantificação das proteínas de parede celular

As proteínas da parede celular de *C. albicans* SC5314, utilizada no “Institute of Medical Sciences” foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), com leitura de absorvância a 595 nm. A quantificação foi aplicada às proteínas não ligadas aos polímeros de manana da parede das células coletadas após aquecimento das amostras em tampão de SDS com β-mercaptoetanol durante a metodologia de extração da parede celular e às proteínas ligadas, após hidrólise ácida dos polímeros (MORA-MONTES et al., 2007). O teste foi realizado em triplicada utilizando 5 µL das amostras proteicas diluídas para 100 µL de água tipo I acrescentando 100 µL de reagente de Coomassie para ensaio de proteínas. A curva analítica foi construída com solução de soroalbumina bovina nas concentrações de 500, 400, 300, 200, 100 e 50 µg/mL.

#### Análise de porosidade da parede celular

A análise de porosidade da parede celular foi feita pela indução de extravazamento de material absorvente de luz UV por meio de interações de polycations (dietilaminoetilcelulose (DEAE)-dextrana e poli-L-lisina) com a membrana celular. De uma cultura em YPD por 16 h a 30 °C, 200 rpm foram tomados

500  $\mu$ L e adicionados a 50 mL de YPD (OD < 0,2) em diferentes frascos e inoculados por 3 h a 30 °C, 200 rpm. Após este período foi mantido um frasco para controle das células sem tratamento e nos demais foram acrescidos, respectivamente, 0,03% de óleo essencial de *M. alternifolia* e 156  $\mu$ g/mL da subFr#49-52. Os frascos foram colocados sob 200 rpm de agitação, 30 °C por mais 2 h.

As células foram então coletadas, centrifugadas e lavadas com água tipo I esterilizada a 4000 rpm por 4 min. Foram adicionados 2 mL de água ao precipitado celular para contagem e ajuste da concentração de células em diferentes microtubos ( $1 \times 10^8$  células/mL). Centrifugou-se os tubos a 13000 rpm, 3 min e aos precipitados em diferentes tubos adicionou-se 1 mL de tampão Tris-HCl pH 7,5, 1 mL de solução de DEAE-dextrana em tampão Tris-HCl a 5  $\mu$ g/mL e 1 mL de solução de poli-L-lisina no mesmo tampão a 15  $\mu$ g/mL. Os microtubos foram incubados por 30 min a 30 °C e 200 rpm. Posteriormente, o sobrenadante foi centrifugado duas vezes a 13000 rpm por 3 min, retirando-se uma alíquota para medida de absorvância de ácidos nucleicos a 260 nm. O teste foi realizado em triplicata a porosidade relativa foi calculada pela razão entre a absorvância da amostra tratada com dextrana e da amostra tratada com poli-L-lisina em relação à absorvância da amostra em tampão (DE NOBEL et al., 1990). Este experimento também foi realizado no "Institute of Medical Sciences".

### 3.2.8. Análise estatística

Os testes foram realizados em triplicatas e os resultados apresentam-se como a média dos valores obtidos  $\pm$  desvio-padrão (exceto o teste de determinação da concentração inibitória e fungicida mínimas, cujo resultado é expresso pela moda dos valores obtidos). Quando necessário foi realizada análise de variância (ANOVA) e aplicado o teste de Tukey ou de Dunnet de comparação de médias. Para análise estatística, considerou-se como significativo valor de  $P < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análise fitoquímica

#### 4.1.1. Óleo essencial de *M. alternifolia*

##### Perfil cromatográfico do óleo essencial de *M. alternifolia* por CCD

A análise por CCD do óleo essencial de *M. alternifolia* indicou que este é constituído por, pelo menos, uma dezena de substâncias de coloração rósea diante do revelador utilizado (Figura 10).



Figura 10: Cromatograma do óleo essencial de *M. alternifolia*. Sistema eluente: hexano:acetato de etila (8:2; v/v). Revelador: anisaldeído sulfúrico/UV.

A coloração observada das manchas no cromatograma da Figura 8 está de acordo com a coloração deste revelador para terpenos, assim descrito em Wagner et al. (1984), e indicou a diversificada presença de terpenóides na constituição do óleo essencial de *M. alternifolia*, o que demonstra conformidade com os dados encontrados na literatura, em que cerca de 90% da composição deste óleo é de derivados terpênicos (CARSON et al., 1998).

##### Perfil cromatográfico do óleo essencial de *M. alternifolia* por CG-EM

O perfil cromatográfico do óleo essencial posteriormente otimizado por CG-EM indicou melhor separação das substâncias presentes no óleo verificando-se cerca

---

de 14 picos mais intensos (Figura 11A), além de vários outros de menor intensidade (Figura 9B).

Após comparação dos espectros de massas gerados para cada pico com os da biblioteca NIST 107 e Saturn, além da comparação com a literatura (SHELLIE et al., 2000; FARAG et al., 2004; SOUTHWELL et al., 2006) foi possível identificar 16 substâncias presentes no óleo essencial de *M. alternifolia*, como indicadas na Figura 11B e apresentadas na Tabela 8.

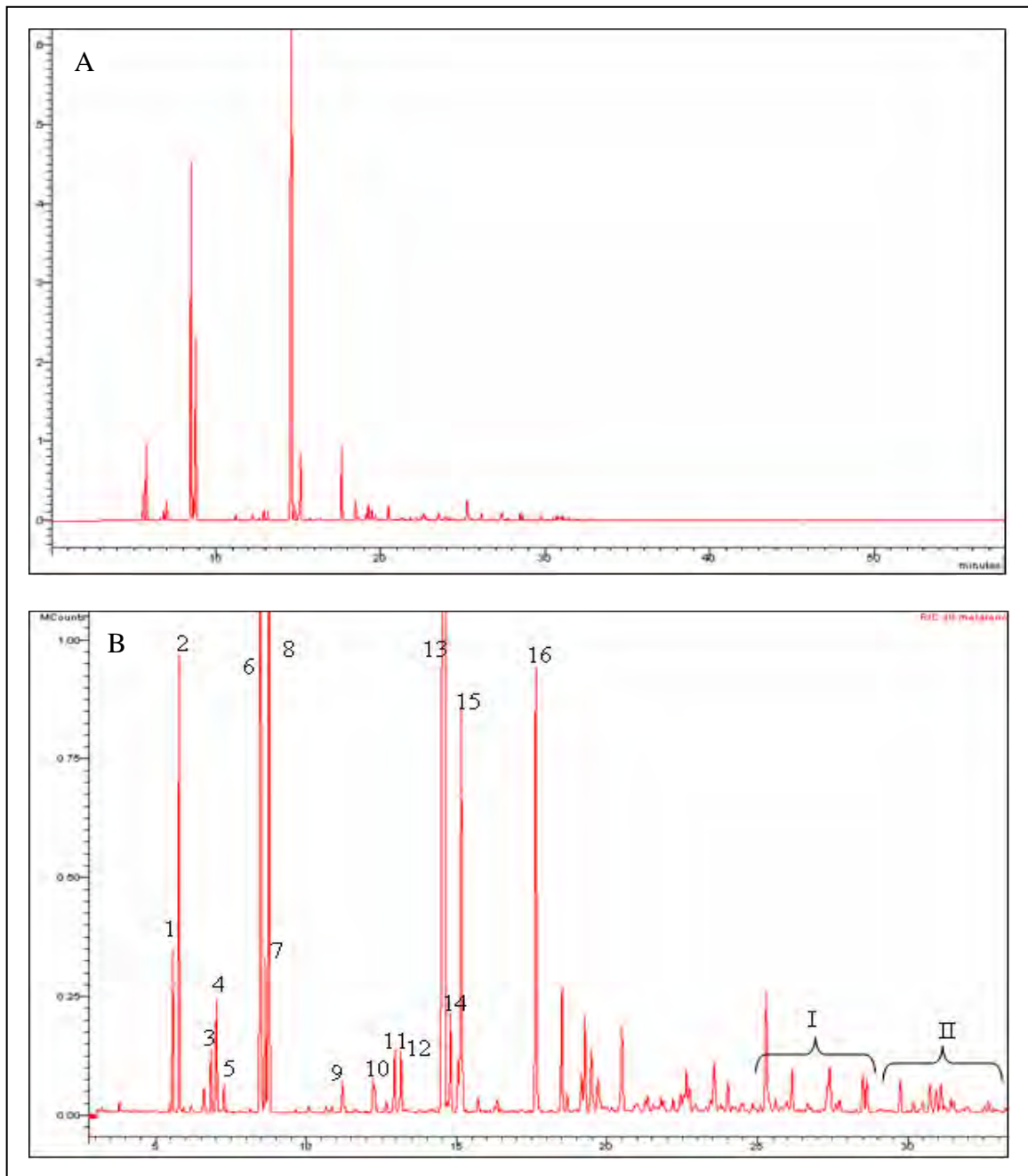


Figura 11: Perfil cromatográfico do óleo essencial de *M. alternifolia* por CG-EM. A) Perfil cromatográfico completo do óleo essencial mostrando os picos mais intensos. B) Perfil cromatográfico expandido do óleo essencial na região de 0 a 30 min. Condições de análise: Coluna VF-5MS, temperatura do injetor: 250 °C; rampa de aquecimento de 60 a 240 °C (3 °C/min); temperatura do *trap*: 230 °C; temperatura da interface: 180 °C; volume de injeção: 1 µL, modo split - 1:20; fluxo do gás de arraste 1 mL/min; intervalo de detecção: 40 a 600 daltons.

Tabela 8: Substâncias identificadas no óleo essencial de *M. alternifolia* por CG-EM.

Pico/Região	Substâncias identificadas	M <sup>+</sup> (m/e)	Pico base
1	$\alpha$ -tujeno	136	91
2	$\alpha$ -pineno	136	93
3	Sabineno	136	93
4	$\beta$ -pineno	136	93
5	$\beta$ -mirceno	136	41
6	<i>p</i> -cimeno	134	119
7	Limoneno	136	43
8	1,8-cineol	154	43
9	terpinen-4-ol	154	71
10	Linalol	154	43
11	$\gamma$ -terpineno	136	41
12	2,4-dodecadienol	152	81
13	$\gamma$ -terpineol	154	121
14	3-decino	150	43
15	$\alpha$ -terpineol	154	59
16	acetato de terpenil	196	43
I	Não identificado	204	
II	Não identificado	222	

A partir dos dados apresentados na Figura 9A e B e na Tabela 8 é possível verificar que o óleo essencial de *M. alternifolia* adquirido para o presente estudo apresenta composição semelhante à composição padrão do óleo essencial desta espécie, como apresentado anteriormente na Revisão Bibliográfica desta espécie.

#### 4.1.2. Folhas de *P. cauliflora*

##### Histoquímica das folhas de *P. cauliflora*

As análises histoquímicas demonstraram que as folhas de *P. cauliflora* apresentam a mesma organização da família Myrtaceae (METCALFE e CHALK, 1950; ISHIKAWA et al., 2008). Foi observada a presença de mesófilo dorsiventral com destaque para as cavidades secretoras e idioblastos contendo cristais de oxalato de cálcio na forma de drusas e monocristais.

Foi verificada a presença de lipídeos principalmente nas cavidades secretoras, sendo que as reações de caracterização histoquímica foram positivas para lipídeos ácidos e insaturados, esteróides, lactonas sesquiterpênicas e terpenóides com grupo carbonila. Também foi evidenciado um resultado positivo pouco expressivo para óleos essenciais. A presença de fenóis foi observada pela reação com cloreto férrico nas nervuras central e periférica e no parênquima paliçádico. Por outro lado, taninos e alcalóides foram observados apenas nas nervuras central e periférica.

A Figura 12 elucida os resultados acima citados apresentando fotos das reações histoanatômicas e histoquímicas indicando a escala de medida ao lado inferior direito.

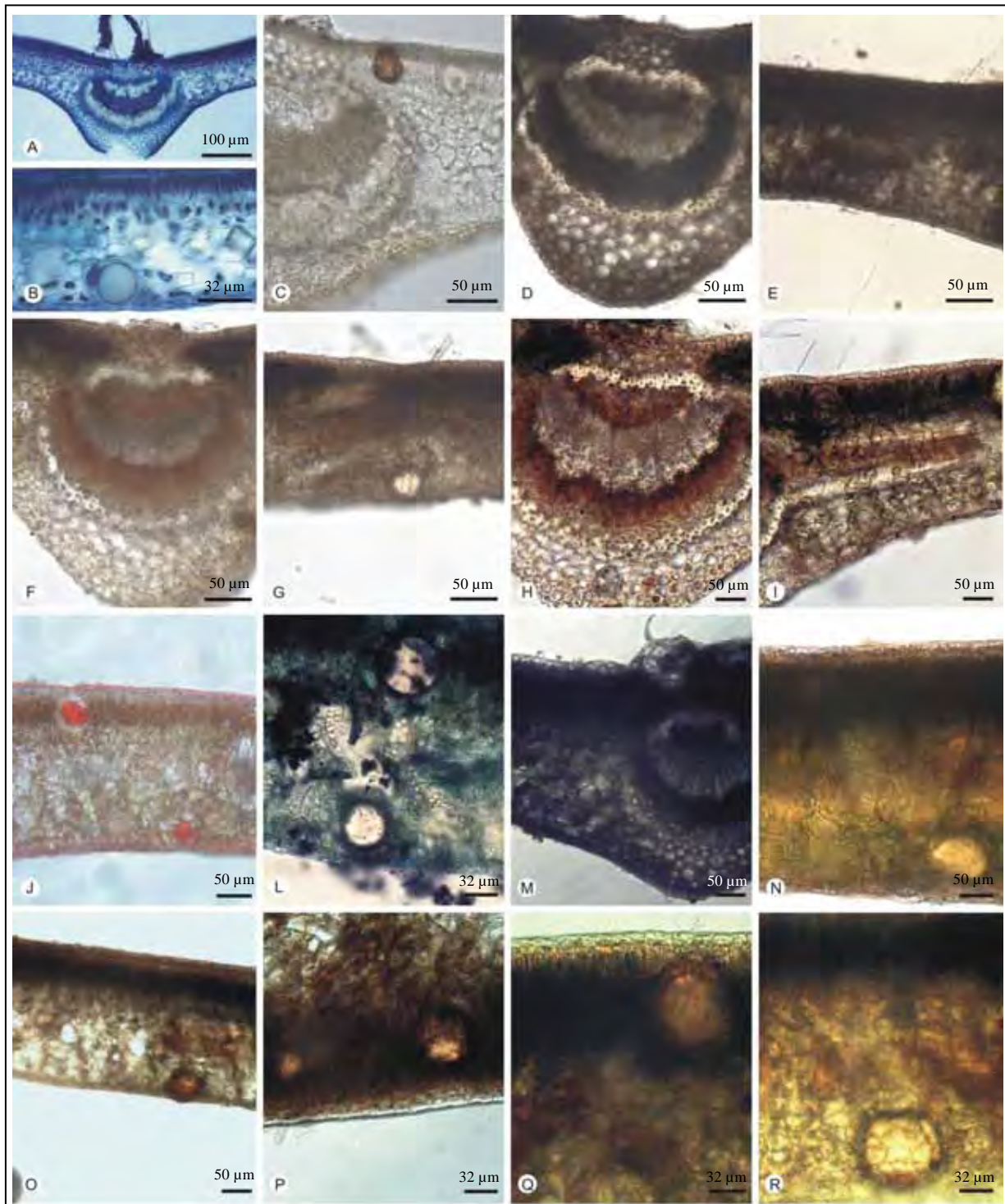


Figura 12: Reações histoquímicas. A) identificação anatômica da nervura central com azul de toluidina. B) identificação anatômica do mesófilo com azul de toluidina. C) controle. D) compostos fenólicos na nervura central. E) compostos fenólicos, nervura periférica e parênquima. F) taninos, nervura central. G) taninos, nervura periférica. H) alcalóides, nervura central. I) alcalóides, nervura periférica. J) lipídeos totais. L) lipídeos ácidos. M) lipídeos insaturados. N) não presença de óleos essenciais e oleoresinas. O) esteróides. P) lactonas sesquiterpênicas. Q) e R) detalhe para terpenóides com grupo carbonila no endotélio das cavidades secretoras.



### Obtenção do extrato e das frações

Os rendimentos do extrato seco das folhas de *P. cauliflora* obtido por percolação com etanol 70% como extrator e das frações obtidas por partição líquido-líquido estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Rendimento do extrato seco das folhas de *P. cauliflora* e das frações.

Material	Material de partida	Rendimento
Extrato das folhas	80 g	30,00%
FrAcOEt	15 g	28,78%
FrBuOH	15 g	41,69%
FrAq	15 g	36,50%

Na Tabela 9, observa-se que o rendimento dos extratos e das frações foi em torno de 30%, indicando que os métodos de percolação e partição líquido-líquido, com os solventes utilizados, resultaram em quantidade suficiente das amostras para estudo

A Figura 13 mostra a CCD do extrato das folhas de *P. cauliflora* e das frações obtidas, comparando a sua constituição frente a dois padrões, rutina e ácido gálico.



Figura 13: Cromatograma do extrato e frações obtidas das folhas de *P. cauliflora*. A) extrato EtOH das folhas. B) FrAcOEt. C) FrBuOH. D) FrAq. E) rutina. F) ácido gálico. Sistema eluente: clorofórmio:metanol:*n*-propanol:água (5:6:1:4; v/v), fase orgânica. Revelador: anisaldeído sulfúrico/UV.

O cromatograma da Figura 13 indica que o extrato das folhas de *P. cauliflora* constitui-se de derivados terpênicos, observados pela coloração lilás de maior Rf, de derivados flavonoídicos, com coloração amarelo fluorescente e Rf intermediário e de derivados de taninos, com coloração acinzentada e menor Rf (WAGNER et al., 1984). Com o fracionamento do extrato foi possível concentrar os derivados terpênicos e flavonoídicos na FrAcOEt, derivados tânicos de média polaridade e alguns flavonóides na FrBuOH e na FrAq, principalmente, derivados tânicos mais polares.

### Análise quantitativa

#### Determinação do teor de fenóis totais

Para a determinação do teor de fenóis totais utilizou-se a equação da reta obtida com a curva analítica do ácido tânico:  $y=0,0357x+0,0061$ , com coeficiente de correlação linear  $r=0,998$ .

O teor de fenóis totais do extrato das folhas de *P. cauliflora*, FrAcOEt, FrBuOH e FrAq pode ser observado, em porcentagem, na Figura 14. A FrAq foi a que apresentou significativamente menor teor, enquanto que a FrBuOH apresentou o maior.

#### Determinação do teor de taninos totais

O teor de taninos totais foi obtido pela diferença entre o teor de fenóis totais das amostras antes e depois de se complexarem e precipitarem com caseína, uma vez que taninos têm a propriedade de complexação com proteínas. O teor de taninos totais está apresentado na Figura 14. O extrato e a FrBuOH foram os que apresentaram maior teor de taninos e com valores próximos.

#### Determinação do teor de flavonóides totais

O teor de flavonóides totais foi determinado para as amostras de acordo com a equação de reta obtida pela curva analítica da quercetina:  $y=0,0789x+0,0139$ , cujo coeficiente de correlação linear  $r=0,997$ . Os valores estão apresentados na Figura 14 e

a FrAcOEt apresentou significativamente maior teor de flavonóides que as demais amostras.

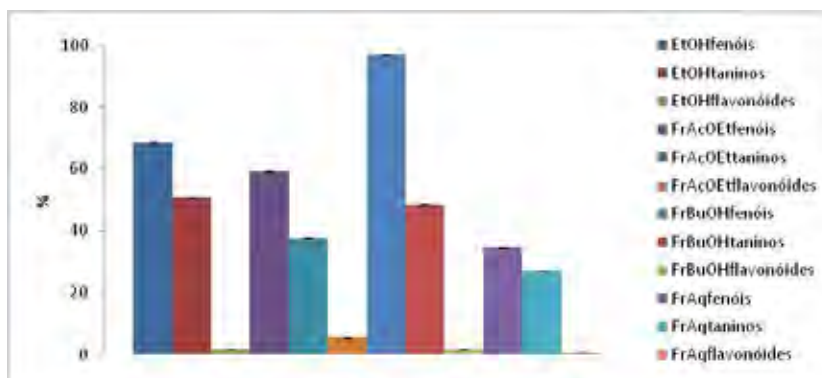


Figura 14: Teores de fenóis, taninos e flavonóides totais das amostras de *P. cauliflora*.

Foi observado que a partição com acetato de etila proporcionou a concentração de flavonóides na FrAcOEt, enquanto que a partição com butanol proporcionou a concentração de fenóis na FrBuOH, com destaque para os taninos. A FrAq foi a que apresentou menor concentração das citadas classes de metabólitos. Todos estes valores relatados são em comparação com os teores de fenóis, taninos e flavonóides totais do extrato.

#### Perfil cromatográfico do extrato de folhas de *P. cauliflora*

O cromatograma do extrato EtOH 70 das folhas proveniente do procedimento de "clean up" apresentou os picos de interesse e, por isso, foi utilizado na determinação do perfil cromatográfico, como mostra a Figura 15.

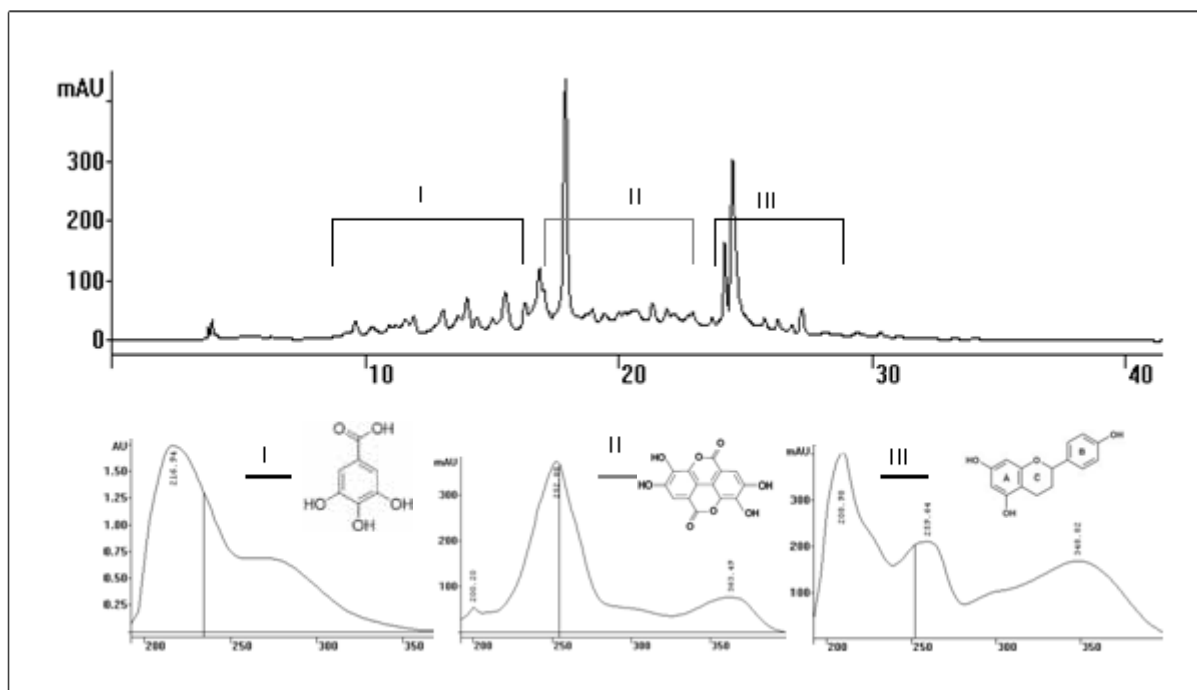


Figura 15: Perfil cromatográfico e espectros de UV. A) Perfil cromatográfico do extrato EtOH 70 das folhas de *P. cauliflora*. B) Espectros na região do UV dos picos. Condições de análise: C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A: H<sub>2</sub>O + 0,05% TFA; Solvente B: ACN + 0,05% TFA. Gradiente de 4-25% de B em A em 20 min, de 25-30% de B até 30 min, de 30-40% de B até 40 min e de 40-100% de B até 60 min; vazão de 1 mL/min, λ 254 nm. I) Espectro UV de derivados de ácido gálico. II) Espectro UV de derivados de ácido elágico. III) Espectro de UV de derivados de flavonóides.

No cromatograma da Figura 15 do extrato EtOH 70 das folhas de *P. cauliflora* verificou-se a presença de mais de 20 picos. Na região entre  $t_r = 16$  a 23 min são evidenciados picos de substâncias com duas bandas de absorção na região do UV em 252 e 363 nm, características de derivados do ácido elágico (GALLO et al., 2006), enquanto que na região de  $t_r = 17$  a 29 min há picos de substâncias com bandas de absorção em 259 e 348 nm, típicas de flavonóides do tipo flavonol (MABRY, 1970). A região  $t_r = 8$  a 15 indica derivados do ácido gálico (SALMINEN et al., 1999).

## Purificação do extrato de *P. cauliflora*

### Cromatografia em coluna

A Figura 16 representa o cromatograma das subfrações obtidas por CC da FrAcOEt juntamente com a FrAcOEt e os padrões rutina e ácido gálico. As subfrações foram agrupadas de acordo com a semelhança de Rf e coloração.

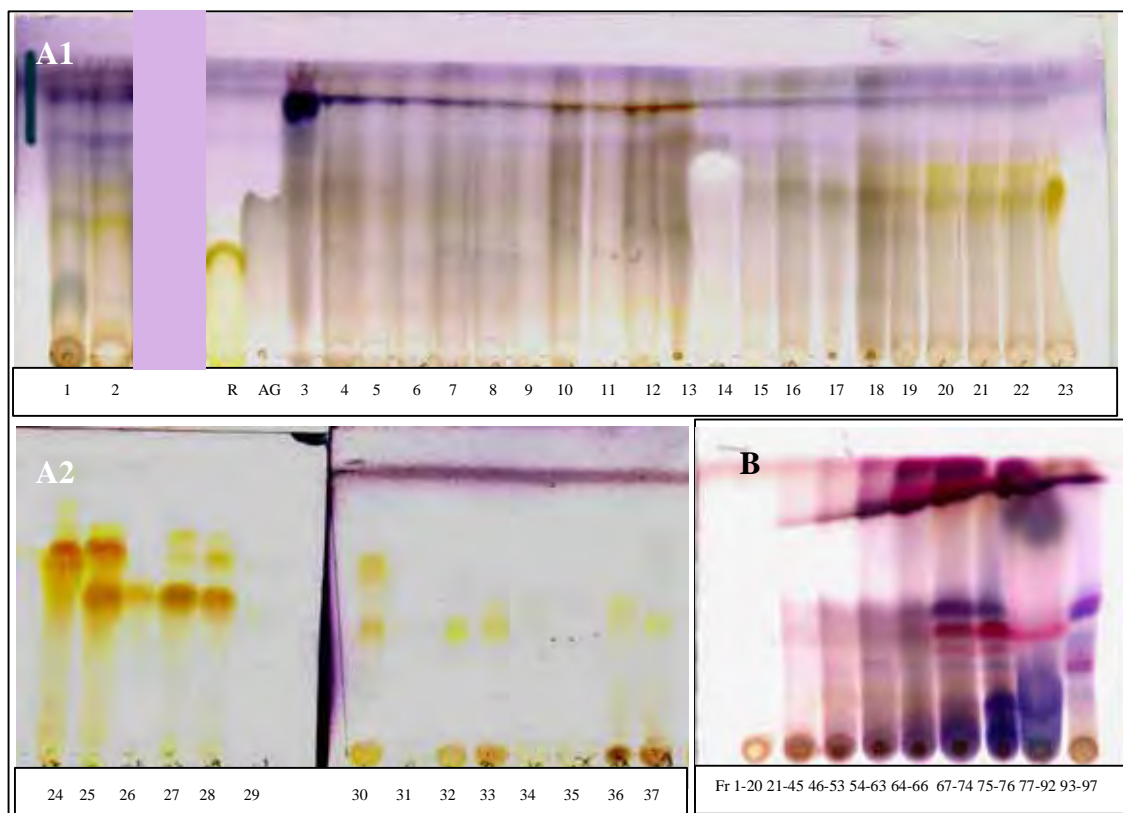


Figura 16: Cromatograma das subfrações da FrAcOEt. A) Cromatograma do extrato EtOH 70 das folhas de *P. cauliflora*, FrAcOEt e sub-frações (sistema eluente: fase orgânica clorofórmio:metanol:*n*-propanol:água, 5:6:1:4 v/v; revelador: anisaldeído sulfúrico/UV). 1) extrato das folhas; 2) FrAcOEt; R- rutina; AG- ácido gálico; 3) sub-fração 98-110; 4) 111-113; 5) 114; 6) 115; 7) 116-118; 8) 119; 9) 120; 10) 121-125; 11) 126; 12) 127-131; 13) 132-138; 14) 139-148; 15) 149; 16) 150-152; 17) 153-162; 18) 163-169; 19) 170-174; 20) 175-179; 21) 180-182; 22) 183-185; 23) 186; 24) 187-188; 25) 189-192; 26) 193-196; 27) 197-198; 28) 199-200; 29) 201-205; 30) 206-207; 31) 208-210; 32) 211-212; 33) 213-215; 34) 216; 35) 217-226; 36) 227-236; 37) 237-241. B) Cromatograma das sub-frações 1-97 (sistema eluente: clorofórmio:metanol, 90:10 v/v; revelador: anisaldeído sulfúrico/UV).

Pela Figura 16B observa-se que nas subfrações de 21 a 97 foram obtidos derivados terpênicos de Rfs diversos. Na Figura 16A1 e 16A2 observa-se que a partir

das subfrações 111-138 mostrou-se presente derivado do ácido gálico pela forma e cor acinzentada das manchas quando comparadas com o padrão de ácido gálico (WAGNER et al., 1984). Por fim, foram obtidos flavonóides a partir da subfração 163 até o final da eluição, sendo que as subfrações de número #201-205, #208-210 e #217-226 foram enviadas para análise estrutural por ressonância magnética nuclear (RMN).

Nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  da subfração #201-205 verificou-se a mistura de dois flavonóides em quantidades diferentes. Foram observados para ambos, os sinais dos hidrogênios H6, H8, H2', H5' e H6' típicos de derivados de quercetina com uma unidade sacarídica cada. Análise do experimento TOCSY com irradiação nos hidrogênios anoméricos, juntamente com análise das constantes de acoplamento de cada substância e comparação com dados da literatura (AGRAWAL, 1989; HARBORNE, 1996), permitiu reconhecer as unidades de açúcar como sendo  $\beta$ -galactose e  $\beta$ -glicose. Assim, as substâncias identificadas foram quercetina-3-O- $\beta$ -glicopiranosídeo e quercetina-3-O- $\beta$ -galactopiranosídeo.

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  das frações #208-210 e #217-226 mostraram sinais correspondentes aos hidrogênios H6, H8 e H2'/6' típicos de derivados da miricetina, além de sinais de hidrogênios anoméricos, o que indicou que estas substâncias sejam flavonóides derivados da miricetina com uma unidade sacarídica. Pelo experimento TOCSY com irradiação nos hidrogênios anoméricos, juntamente com análise das constantes de acoplamento de cada substância e comparação com dados da literatura (AGRAWAL, 1989; HARBORNE, 1996), verificou-se que as unidades de açúcar correspondem, respectivamente, a  $\beta$ -alose e  $\beta$ -galactose. Desta maneira, as substâncias identificadas foram miricetina-3-O- $\beta$ -alopiranosídeo (Myr-alose) para a subfração #208-210 e miricetina-3-O- $\beta$ -galactopiranosídeo (Myr-galactose) para a #217-226.

A Figura 17 representa as substâncias isoladas e identificadas das subfrações #201-205, #208-210 e #217-226 obtidas por CC da FrAcOEt.

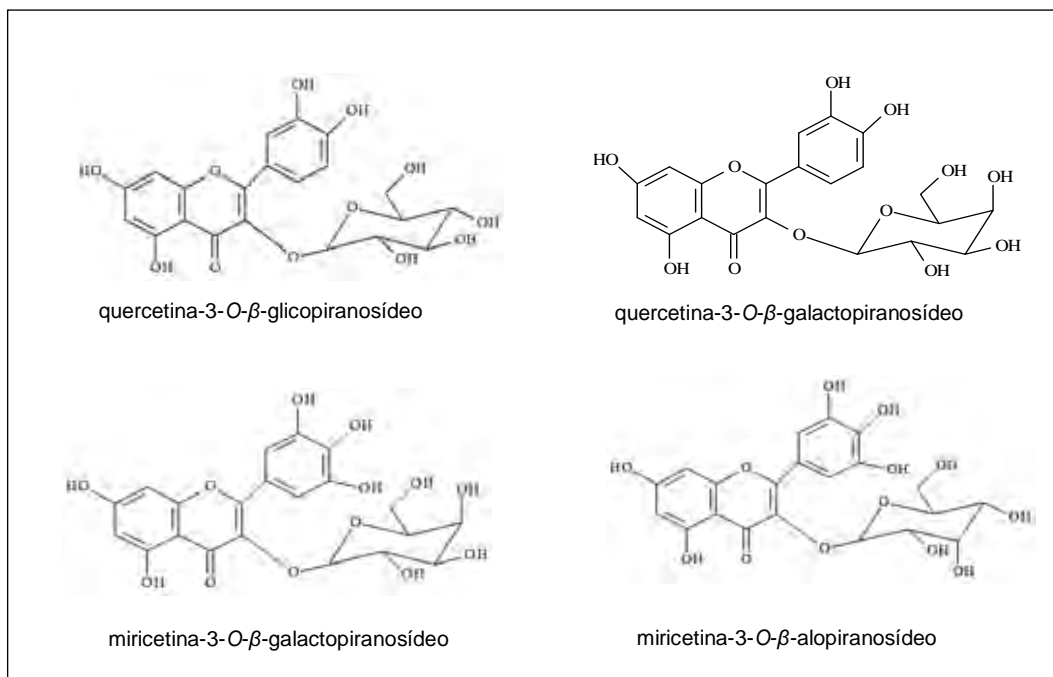


Figura 17: Flavonóides isolados e identificados da FrAcOEt.

### Cromatografia em contra-corrente de alta velocidade

Na Figura 18 é mostrado o cromatograma das subfrações obtidas por HSCCC a partir da FrBuOH, a FrBuOH e rutina como padrão. As subfrações foram agrupadas pela semelhança de coloração e R<sub>f</sub>.

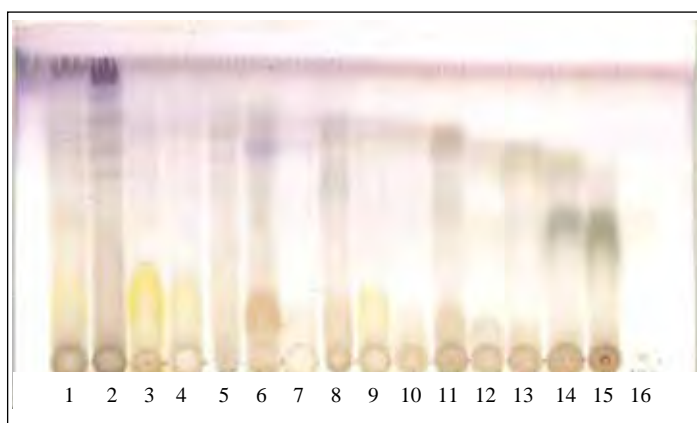


Figura 18: Cromatograma das sub-frações da FrBuOH (1-152), da FrBuOH do extrato EtOH 70 das folhas de *P. cauliflora* e rutina (sistema eluente: fase orgânica clorofórmio:metanol:*n*-propanol:água, 5:6:1:4 v/v; revelador: anisaldeído sulfúrico/UV). 1) FrBuOH; 2) sub-fração 35-48; 3) 49-52; 4) 53-54; 5) 55-60; 6) 61-66; 7) 67-68; 8) 69-79; 9) 80-83; 10) 84-93; 11) 94-104; 12) 105-106; 13) 107-110; 14) 111-113; 15) 114-122; 16) 123-130.

Para otimizar a etapa de purificação das sub-frações, a determinação de CIM e CFM foi realizada primeiramente, indicando a sub-fração #49-52 com melhor atividade e que então foi purificada por HPLC, resultando nas subfrações 1 (6,3 mg), 2 (13 mg) e 3 (20,8 mg), conforme cromatograma apresentado na Figura 19.

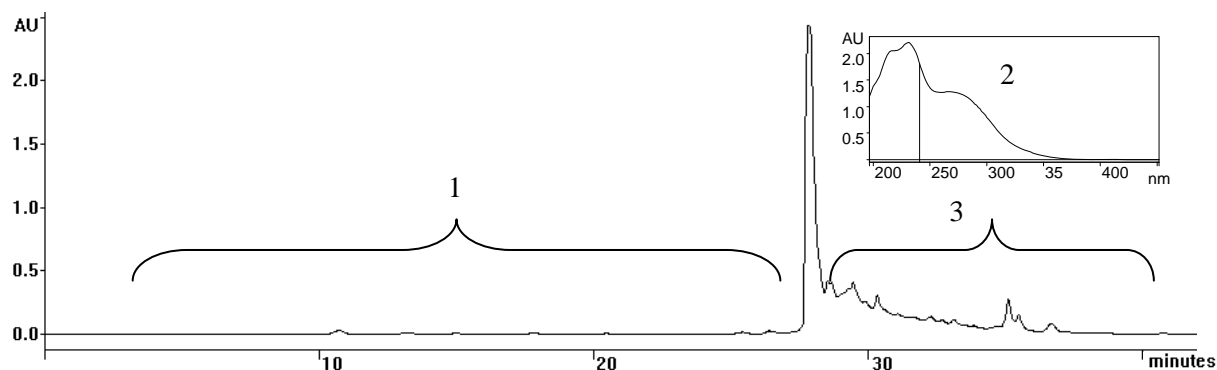


Figura 19: Cromatograma de purificação de subFr #49-52 da FrBuOH do extrato EtOH 70 das folhas de *P. cauliflora*. (C18, 250 x 10 mm d.i. x 5  $\mu$ m); Solvente A: H<sub>2</sub>O + 0,05% TFA; Solvente B: MeOH + 0,05% TFA. Gradiente de 20% de B em A em 15 min, de 20-50% de B até 25 min e 45-100% de B até 30 min; vazão de 2 mL/min,  $\lambda$  254 nm.

A subFr 2, indicada no cromatograma como o pico mais intenso foi obtida como sólido amorfo de coloração amarelo clara. O espectro de ultravioleta exibiu bandas com máximos de absorção em 220 e 265 nm, sugestivo de um elagitanino (SALMINENM et al., 1999). Os espectros de massas registrados por espectrometria de massa com ionização por eletrospray (ESI-MS) forneceram os íons [M+H]<sup>+</sup> em m/z 937 e [M-H]<sup>-</sup> em m/z 935. O espectro de RMN <sup>1</sup>H exibiu um singlete em  $\delta$  6,94 (2H) de uma unidade de galoil, três outros singletos de duas unidades HHDP (hexaidroxidifenóis) em  $\delta$  6,57 (1H),  $\delta$  6,29 (1H) e  $\delta$  6,25 (1H), além de sinais de um resíduo de carboidrato na região de  $\delta$  5,38-4,00. A partir da análise dos espectros HSQC e HMBC foram obtidos os valores de RMN <sup>13</sup>C. A análise detalhada dos espectros HSQC, HMBC e 1H-1H COSY, em comparação com dados da literatura, permitiu a identificação do elagitanino (tanino hidrolisável) casuarinina, apresentado na Figura 20, isolado anteriormente de *Casuarina stricta* (OKUDA, 1983). Os dados de



RMN e os espectros de massa obtidos estão apresentados no Anexo A e são totalmente compatíveis com os disponíveis na literatura.

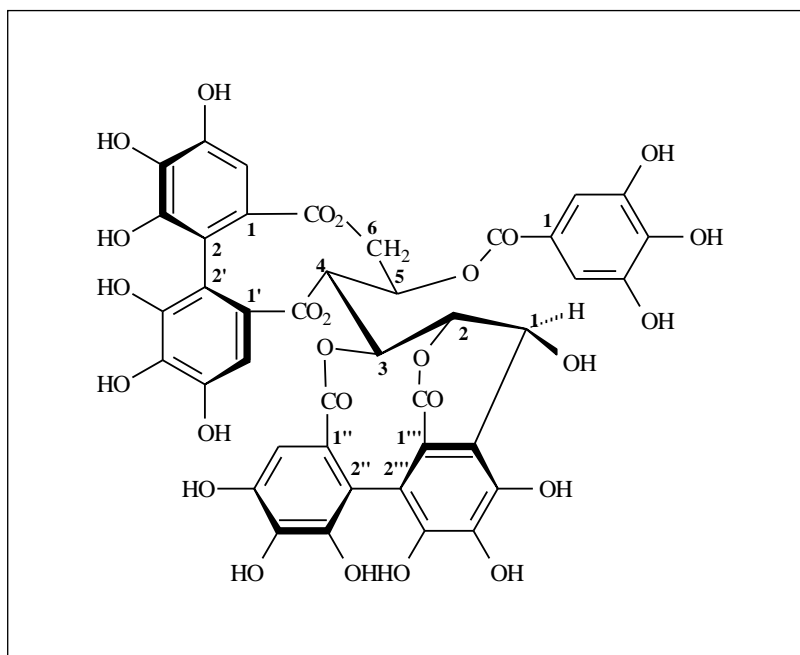


Figura 20: Estrutura do elagitanino casuarinina.

### Cromatografia líquida de média eficiência

A FrAq submetida a MPLC em coluna de fase reversa gerou 74 subfrações, agrupadas de acordo com a semelhança de Rf e quantificadas como apresentado na Tabela 10.

Tabela 10: Agrupamento resultante do fracionamento da FrAq.

Subfração	Quantidade	Subfração	Quantidade
1	64 mg	20-23	3 mg
2-6	60 mg	24-34	7 mg
7-9	22 mg	35-43	5 mg
10-11	5 mg	44-54	9 mg
12-18	10 mg	54-74	6 mg

Pela quantificação das sub-frações agrupadas da FrAq, observa-se que a maior massa é obtida nas primeiras sub-frações, momento em que o gradiente de eluição tem sua maior porcentagem constituída por água, indicando a alta polaridade dos

compostos presentes nesta fração. No entanto, as sub-frações obtidas não apresentaram consideráveis valores de CIM, não sendo prosseguidos os estudos químicos desta fração.

A Figura 21 esquematiza os resultados dos estudos fitoquímicos para o extrato das folhas de *P. cauliflora*.

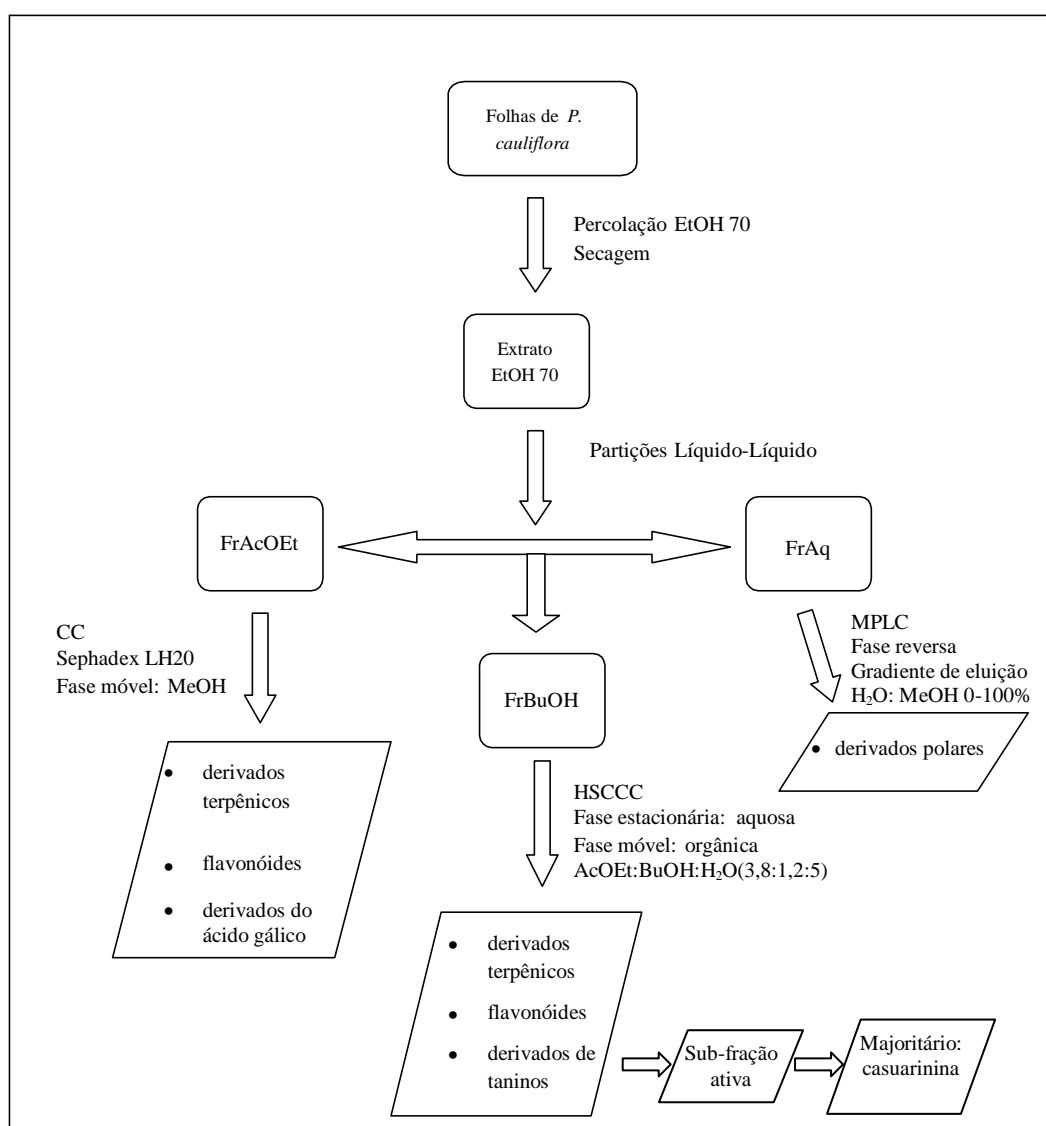


Figura 21: Esquema dos resultados fitoquímicos obtidos sobre a constituição das folhas de *P. cauliflora*.

## 4.2. Avaliação da atividade antimicrobiana

### Teste de difusão em ágar

A primeira avaliação da atividade anti-*Candida* do óleo essencial de *M. alternifolia*, do extrato e das frações obtidas das folhas de *P. cauliflora* foi realizada pelo método de difusão em ágar baseado no documento M44-A2 do CLSI e utilizando “templates” de 6 orifícios de 6 mm de diâmetro. A média dos valores dos halos de inibição e o desvio-padrão dos resultados estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Valores dos halos de inibição frente às espécies de *Candida*.

	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>
Óleo essencial	10,59±0,45 <sup>a</sup>	9,00±1,50	10,52±1,20	12,40±1,54
Extrato	16,02±2,10	9,92±1,00	12,90±2,08	11,31±1,07
FrAcOEt	17,65±1,80	9,33±1,20	15,00±1,19	16,26±1,08
FrBuOH	15,02±1,90	10,42±2,21	16,34±2,19	12,11±2,61
FrAq	18,84±1,58	11,63±1,57	14,77±1,32	11,48±2,08
anfotericina B	23,28±1,42	11,16±2,12	15,18±1,42	18,04±2,47

a) Os valores estão apresentados como média de 3 repetições ± desvio-padrão, em mm.

Pôde-se observar que o óleo essencial de *M. alternifolia* diluído a 4% em solução aquosa de Tween 80 apresentou menor atividade contra as leveduras do que as demais amostras. Todas as espécies apresentaram sensibilidade às amostras vegetais testadas, sem diferenças significativas entre si contra a mesma espécie.

O controle de solvente não formou halo de inibição, não interferindo no resultado das amostras vegetais.

### Determinação da concentração inibitória mínima e da concentração fungicida mínima

Foram determinadas a CIM e CFM do óleo essencial, extrato das folhas de *P. cauliflora*, frações, sub-frações, anfotericina B e fluconazol contra *C. albicans*, *C. krusei*,

*C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Os valores de CIM e CFM das amostras estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Valores de CIM e CFM das amostras vegetais.

Amostras	<i>C. albicans</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. tropicalis</i>	
	CIM <sup>1</sup>	CFM <sup>1</sup>	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
Óleo essencial	0,50	0,50	0,50	0,50	0,25	0,25	0,03	0,03
Extrato EtOH 70	156	625	19	39	78	156	312	1250
FrAcOEt	625	1250	19	78	312	625	312	625
Subfr#54-98	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250
Subfr#99-241	312	625	156	156	312	> 1250	312	312
Subfr#119	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Subfr#139-148	>200	>200	50	>200	200	>200	200	>200
Subfr#183-185	50	>50	50	>50	>50	>50	>50	>50
Subfr#187-188	>950	>950	118,75	>950	950	>950	950	>950
Subfr#189-192	1375	2750	171,9	>2750	1375	>2750	1375	2750
Subfr#193-196	>150	>150	>150	>150	>150	>150	>150	>150
Quercetinas	500	500	65	>500	500	>500	250	>500
Subfr#206-207	600	600	75	>600	>600	>600	600	>600
Myr-alose	500	500	65	>500	500	>500	500	>500
Myr-galactose	250	500	250	>500	125	250	250	250
FrBuOH	78	1250	19	39	19	19	156	1250
Subfr#35-48	625	>1250	19	1250	625	>1250	312	>1250
Subfr#49-52	78	312	625	>1250	156	1250	312	>1250
Subfr#1	630	630	39	315	630	630	305	630
Casuarinina	580	580	26	580	580	580	145	580
Subfr#3	610	610	76	610	610	610	150	610
Subfr#61-65	1125	2250	17,6	>1250	562,5	>2250	562,5	>2250
Subfr#114-122	1250	>1250	78	>1250	1250	>1250	1250	>1250
FrAq	312	>1250	39	78	39	78	312	1250
Subfr#1	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250
Subfr#7-9	>1110	>1110	>1250	>1250	1250	>1250	>1250	>1250
Subfr#12-18	>1000	>1000	NR	NR	>1250	>1250	>1250	>1250
anfotericina B	0,25	0,25	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	2,00
fluconazol	4,0	8,0	32	32	4,0	4,0	32	32

1- CIM e CFM para o óleo essencial de *M. alternifolia* estão expressas em %. CIM e CFM para as amostras de *P. cauliflora* estão expressas em µg/mL. 2- NR = não realizado por falta de massa da amostra.

Os controles negativos de solução 1% de Tween 80 e de solução de DMSO:RPMI (1:5; v/v) não apresentaram inibição de crescimento das espécies de *Candida* testadas, indicando que não interferiram nos valores de CIM e CFM obtidos para as amostras. Os valores de CIM e CFM dos controles positivos de anfotericina B e fluconazol estiveram dentro dos limites recomendados para CIM de 48 h para

microdiluição em caldo pela Norma M27-A2 do NCCLS (2002) para as espécies de *C. krusei* e *C. parapsilosis*, sendo que o teste também foi aplicado a *C. albicans* e *C. tropicalis*, como apresentado na Tabela 13. Contudo, a referida norma tem limitações para aplicação com extrativos vegetais. Entre tais limitações, a leitura visual do resultado é dificultada pela coloração apresentada pelas amostras vegetais. Assim, foi utilizado o corante TTC, de acordo com o trabalho de Duarte et al. (2005). A CIM foi definida pelo ponto de clara mudança de coloração de amarelo para vermelho (ELLOF, 1998).

Os valores de CIM e CFM obtidos para o óleo essencial de *M. alternifolia* apresentaram-se entre 0,25 a 0,50%, exceto para *C. tropicalis*, que foi a espécie mais sensível. Para o óleo essencial, os valores de CIM e CFM foram semelhantes, indicando que o óleo essencial é fungicida. Para ser fungicida, o agente antifúngico em determinada concentração deve proporcionar a morte de 99,9% de unidades formadoras de colônia (SÓCZÓ et al., 2007).

De forma geral, o extrato das folhas de *P. cauliflora*, a FrBuOH e a subFr #49-52 foram as amostras que apresentaram melhores valores de CIM e CFM, sendo que a espécie de *C. krusei* foi a que indicou maior sensibilidade. A FrAq e a subFr #208-210, identificada como a que contém o flavonóide miricetina-3-O- $\beta$ -alopiranosídeo, também apresentaram interessantes valores de CIM e CFM, embora maiores que as amostras antes citadas. As demais frações e sub-frações apresentaram valores de CIM e CFM mais elevados, ou, como apresentado na Tabela 12, não apresentaram atividade antimicrobiana na maior concentração utilizada no teste.

Na leitura do teste de determinação de CIM com o extrato e as sub-frações de *P. cauliflora* foi observado o fenômeno de “trailing”, que problematiza o estabelecimento de um “end-point” claro. Frente a este fato, a determinação do ponto de CIM foi baseado no primeiro poço que apresentava clara coloração vermelha e não rósea (existente nos pontos onde ocorreu “trailing”), assim como Liu et al. (2007) estabeleceu o mesmo parâmetro para este tipo de determinação com resazurina.

Uma vez que a subFr #49-52 foi a que de forma geral indicou melhor atividade, foram obtidas por HPLC três diferentes frações, sendo que em uma delas foi isolado o composto majoritário casuarinina. Estas outras frações apresentaram-se

menos efetivas que a sub-fração que as originou e observou-se que não existia sinergismo entre tais compostos nem entre eles e a subFr #49-52, pois após o cálculo da concentração inibitória fracional obteve-se valor 1, o que de acordo com odds (2003), significa que não há interferência de atividade entre as amostras.

É possível observar que os valores de CFM são significativamente maiores que os valores de CIM, indicando que as amostras ativas obtidas a partir do extrato das folhas de *P. cauliflora* são fungistáticas como o fluconazol, mas não fungicidas como a anfotericina B.

A Tabela 13 compara os valores de CIM obtidos com a espécie de *C. albicans* de referência e a cepa de isolado clínico analisada durante estágio no “Aberdeen Fungal Group”.

Tabela 13: Valores de CIM das amostras vegetais contra *C. albicans* cepa de referência e cepa de isolado clínico.

Amostras	ATCC 64548	SC5314
Óleo essencial	0,50%	0,25%
Extrato EtOH 70	156 µg/mL	156 µg/mL
FrBuOH	78 µg/mL	156 µg/mL
subFr#49-52	78 µg/mL	312 µg/mL
Casuarinina	580 µg/mL	>580 µg/mL
Myr-alose	500 µg/mL	>500 µg/mL
Myr-galactose	250 µg/mL	250 µg/mL

Exceto o óleo essencial, o extrato etanólico e a miricetina-3-O-galatopiranosídeo, as demais amostras apresentaram maior valor de concentração inibitória mínima para a cepa de *C. albicans* obtida de isolado clínico.

#### 4.3. Efeitos sobre a curva de morte

Neste teste trabalhou-se com algumas das recomendações de Klepser et al. (1998), como inóculo inicial entre  $10^4$  a  $10^6$  UFC/mL e com o conceito de que para ser

fungicida, a amostra deve promover uma redução  $\geq 99,9\%$  em UFC/mL do inóculo inicial e para ser fungistática, a redução deve ser  $< 99,9\%$ .

As leveduras tratadas com o óleo essencial de *M. alternifolia* e fluconazol apresentaram redução do número de unidades formadoras de colônia por mililitro de suspensão ao longo das 24 h de tratamento em comparação com as leveduras não submetidas a tratamento. Contudo, a redução observada não foi estatisticamente significativa. A FrBuOH não promoveu a redução do número de colônias e estes dados podem ser observados na Figura 22.

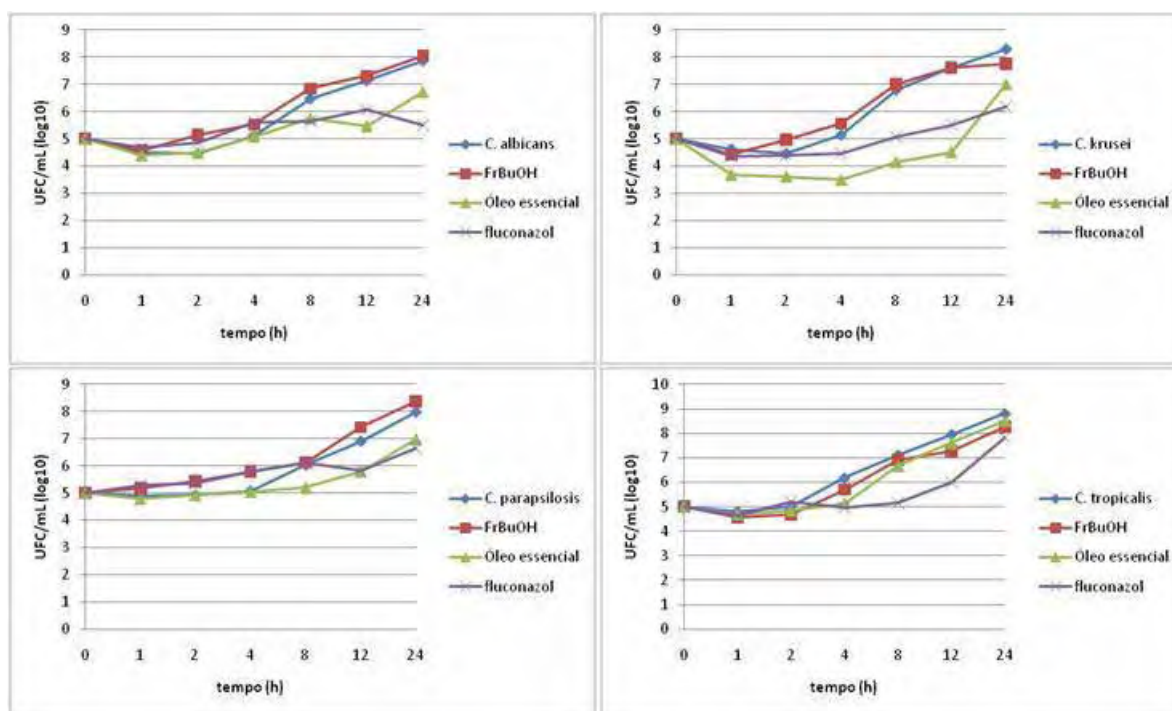


Figura 22: Curva de crescimento de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* sem tratamento e tratadas com o óleo essencial de *M. alternifolia*, FrBuOH do extrato de *P. cauliflora* e fluconazol.

Durante a avaliação do efeito das amostras vegetais nas cepas de *Candida* observou-se redução  $< 99,9\%$  do inóculo inicial. Assim, já é conhecida a ação fungistática de fluconazol, mas o que se depreende é que em concentração sub-CIM o óleo essencial pode atuar de forma fungistática, e que por esta metodologia confirmou-se a ação fungistática da FrBuOH, dado importante para caracterizar a forma de atuação de um novo agente antifúngico.

#### 4.4. Avaliação da citotoxicidade

Para avaliação da citotoxicidade observou-se a concentração citotóxica de 50% (CC50) das células para as amostras vegetais que mostraram melhor atividade antifúngica. Na Tabela 14 estão colocadas as faixas de concentração em que ocorre redução de 50% da viabilidade das células de fibroblasto da linhagem SIRC.

Tabela 14: Faixa de concentração que promove redução de 50% (CC50) de viabilidade celular para células SIRC.

Amostras	Concentração
Óleo essencial de <i>M. alternifolia</i>	0,06 – 0,12%
Extrato de <i>P. cauliflora</i>	250 – 500 µg/mL
FrAcOEt	125 – 250 µg/mL
quercetinas	200 µg/mL
Myr-alose	>200 µg/mL
Myr-galactose	>200 µg/mL
FrBuOH	500 – 1000 µg/mL
Subfr #49-52	>400 µg/mL
Subfr #1	>126 µg/mL
casuarinina	>116 µg/mL
Subfr #3	>122 µg/mL
FrAq	1000 – 2000 µg/mL

Na Figura 23 pode ser observado a curva de citotoxicidade das diferentes amostras vegetais em diferentes concentrações.



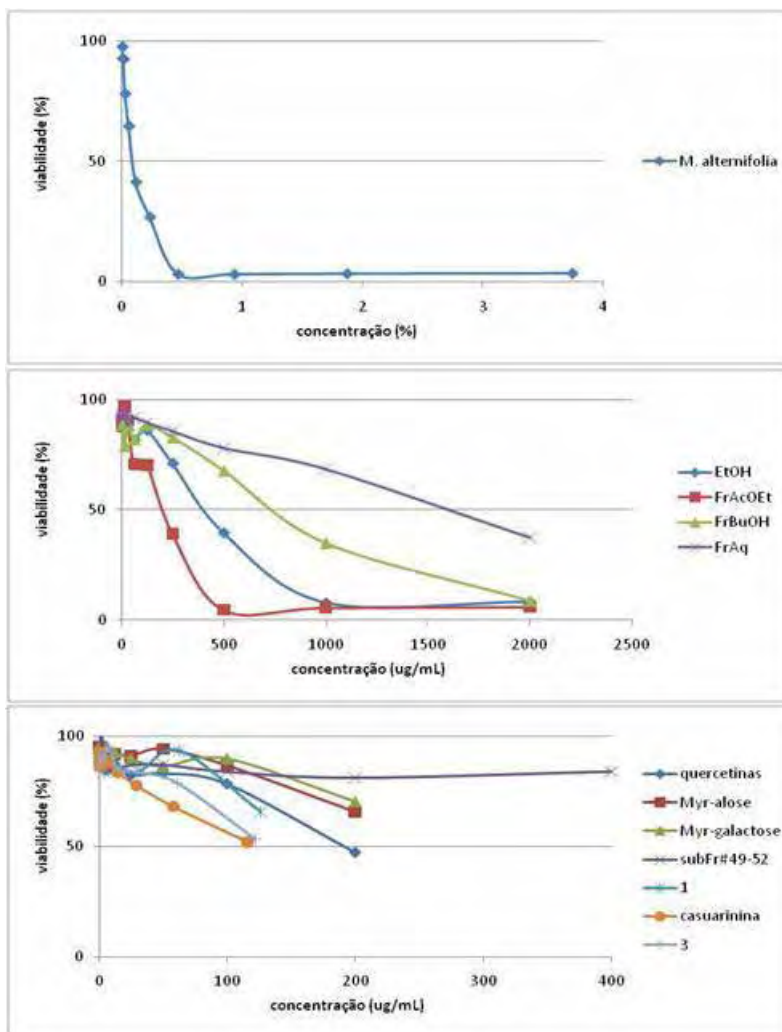


Figura 23: Curva de citotoxicidade das amostras vegetais em diferentes concentrações. A) Óleo essencial de *M. alternifolia*. B) Extrato das folhas de *P. cauliflora* e das frações. C) Sub-frações de *P. cauliflora*.

É possível observar que o óleo essencial de *M. alternifolia* apresentou citotoxicidade para a linhagem de fibroblastos em uma baixa concentração, estando inclusive dentro da faixa de concentração de atividade contra as cepas de *Candida*.

Entre as amostras obtidas da espécie de *P. cauliflora*, observa-se maior citotoxicidade para a FrAcOEt, seguida pelo extrato. As sub-frações semi-purificadas e purificadas não apresentaram CC50 na maior concentração testada, exceto para subfração #201-205, que foi identificada como uma mistura de quercetina-3-O-glicopiranosídeo e quercetina-3-O-galactopiranosídeo.

#### 4.5. Alteração morfológica

Para classificação da morfologia das leveduras foi adotado o critério baseado no trabalho de Sudbery et al. (2004), que classifica hifa como a célula que se desenvolve de um blastóporo não tendo constricção na região de divisão e tem os lados paralelos ao seu longo, enquanto que pseudo-hifa é a forma com constricção na região de divisão com a célula-mãe e a cada subsequente junção de septos.

O tratamento com o óleo essencial resultou em uma redução significativa do número de pseudo-hifas, tubos germinativos e hifas, com 24 e 48 h de *C. tropicalis*, também ocorrendo redução desses números com os tratamentos da FrBuOH e anfotericina B, como pode ser observado na Figura 24.

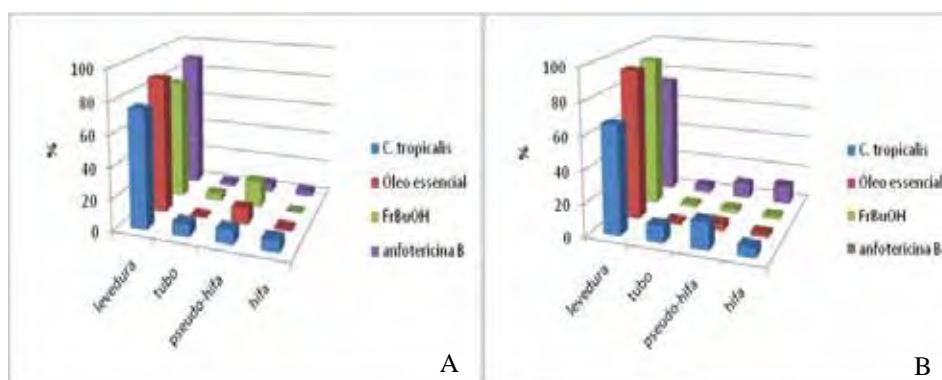


Figura 24: Porcentagem de formação de levedura, tubo germinativo pseudo-hifa e hifa em *C. tropicalis* sob diferentes tratamentos. A) Após 24 h. B) Após 48 h.

Entre os dados da Figura 24 foi possível observar que existe um aumento do número de células na forma de levedura para todos os tratamentos. Notou-se que houve redução do número das formas de hifa quando comparados tratamentos com a cultura que não recebeu tratamento. Para a formação de pseudo-hifa o tratamento com o óleo essencial e a FrBuOH promoveu aumento com 24 h e redução após 48 h, enquanto que o controle de anfotericina B causou redução nos dois períodos. Observou-se que anfotericina B diminuiu o número de tubos germinativos, efeito que também pôde ser observado para os outros tratamentos.

A formação de hifa foi totalmente inibida com a cepa clínica de *C. albicans* tratada com o óleo essencial de *M. alternifolia* na concentração de 0,25%, 0,12% e na concentração de 0,03% em meio de Lee. Em oposição, a sub-fração #49-52 não inibiu a formação de hifa, porém o comprimento do filamento foi significativamente menor em comparação com o filamento da amostra de controle em meio com soro bovino fetal, como pode ser observado na Figura 25.

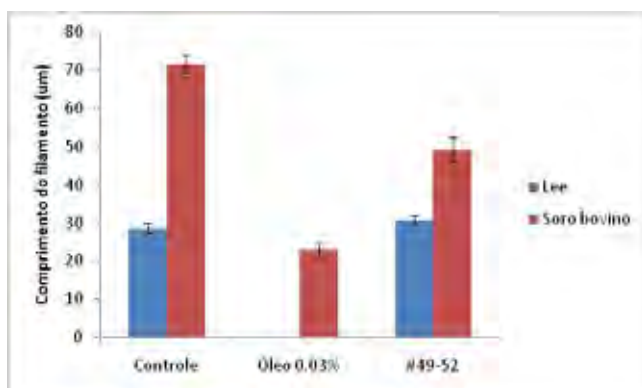


Figura 25: Comprimento, em µm, do filamento da hifa de *C. albicans* SC5314 controle e tratada com as amostras vegetais.

Devido ao fato de não ocorrer alteração significativa de fluorescência das células de *C. tropicalis* nem *C. albicans* SC5314 coradas com Calcofluor White entre as amostras tratadas comparadas com os controle das espécies, não foi possível sugerir alteração de quitina da parede celular por esta metodologia para as células na forma de hifa. Contudo, é possível visualizar uma pequena redução de intensidade de fluorescência quando os filamentos são tratados com o óleo essencial a 0,03% (Figura 26).

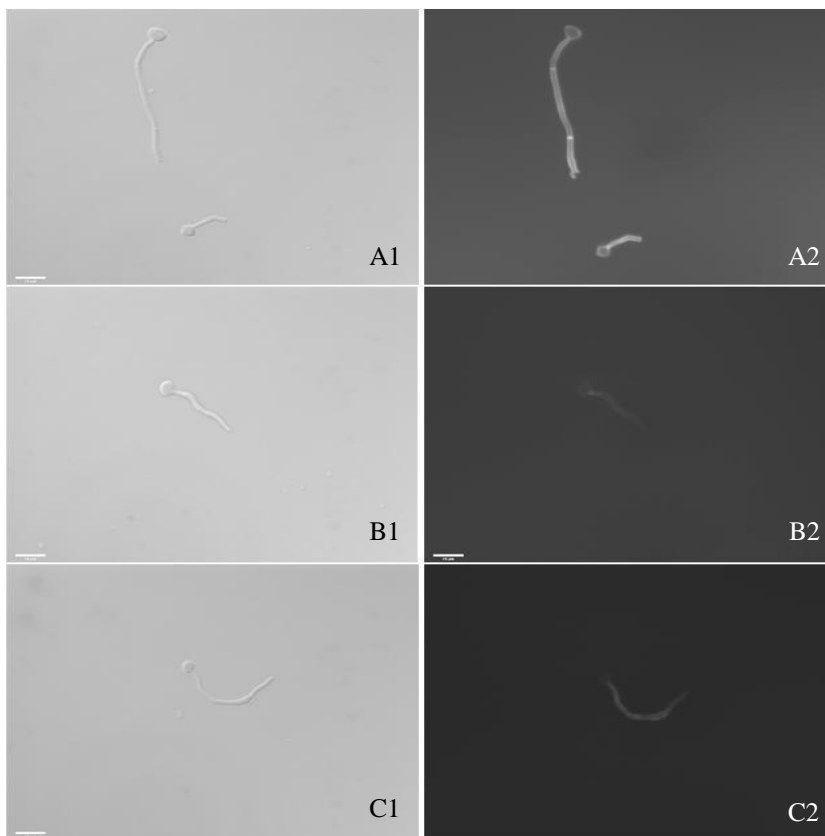


Figura 26: Células hifais de *C. albicans* SC5314 coradas com Calcofluor White. A1) Controle sem fluorescência. A2) Controle visualizado com fluorescência. B1) Tratadas com 0,03% de óleo essencial, sem fluorescência. B2) Tratadas com 0,03% de óleo essencial, visualizadas com fluorescência. C1) Tratadas com a subr#49-52, sem fluorescência. C2) Tratadas com a subr#49-52, visualizadas com fluorescência.

#### 4.6. Efeitos sobre ergosterol

##### Ligação a ergosterol exógeno

A propriedade das amostras vegetais ativas ligarem-se diretamente ao ergosterol foi verificada pela adição de ergosterol exógeno ao método de determinação de CIM. Os valores de concentração inibitória mínima na presença de excesso de ergosterol para essas amostras estão colocados na Tabela 15.

Tabela 15: Valores de CIM para as amostras vegetais ativas com adição de ergosterol exógeno.

Amostras	<i>C. albicans</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. tropicalis</i>	
	CIM <sup>1</sup>	CFM <sup>1</sup>	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
Óleo essencial	0,50	0,50	1	1	1	1	0,125	0,125
EtOH 70	5000	>5000	39	5000	312	5000	625	1250
FrAcOEt	5000	>5000	39	5000	1250	>5000	625	5000
FrBuOH	5000	>5000	39	5000	1250	>5000	312	625
FrAq	5000	>5000	78	>5000	2500	>5000	625	5000
Subfr #49-52	1250	>5000	78	>5000	1250	>1250	312	5000
fluconazol	32	>64	64	>64	4	16	64	>64
anfotericina	2,0	16	>16	>16	16	16	4	8

1- CIM e CFM para o óleo essencial de *M. alternifolia* estão expressas em %. CIM e CFM para as amostras de *P. cauliflora* estão expressas em µg/mL.

É possível observar que os valores de CIM para o óleo essencial de *M. alternifolia* não se alterou significativamente contra as quatro espécies de *Candida* testadas, indicando não existir ligação entre os compostos presentes no óleo e a molécula de ergosterol.

As amostras advindas de *P. cauliflora*, de forma geral, apresentaram CIM maior que 4x o valor de CIM sem adição de ergosterol. Este resultado indica a ligação de ergosterol aos compostos fenólicos presentes nessas amostras.

Percebe-se, nitidamente, que o antifúngico de controle anfotericina B aumenta mais do que 4x seu valor de CIM, uma vez que seu mecanismo de ação deve-se à ligação com a molécula de ergosterol. O antifúngico fluconazol, por outro lado, cujo mecanismo de ação tem como alvo a síntese e não a ligação ao ergosterol, não expressou alteração significativa dos valores de CIM, permanecendo dentro dos limites preconizados pelo NCCLS (2002).

### Quantificação de ergosterol

A inibição da biossíntese de ergosterol foi verificada pela quantificação de ergosterol extraído de culturas das cepas de *Candida* tratadas com óleo essencial de *M. alternifolia*, FrBuOH e fluconazol. A média da porcentagem de ergosterol presente em cada extração e a porcentagem de redução estão apresentadas na Tabela 16.

Tabela 16: Inibição da biossíntese de ergosterol.

	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>
Sem tratamento	1,38±0,32	1,13±0,70	0,34±0,30	1,94±0,10
Óleo essencial	1,20±0,04(-13)	0,74±0,77(-35)	0,29±0,33(-11)	1,45±0,57(-25)
FrBuOH	2,03±0,77(+48)	1,44±0,58(+28)	0,77±0,70(+29)	1,30±0,86(-33)
Fluconazol	0,40±0,23(-71)*	0,68±0,08(-40)	0,05±0,05(-84)*	0(-100)*

<sup>1</sup>Média do conteúdo de ergosterol expressa como porcentagem em relação ao peso seco da célula ± desvio-padrão (seguido em parênteses pela porcentagem de redução [-] ou de aumento [+] do conteúdo de ergosterol comparado ao controle sem tratamento).

\*Significante em relação ao controle ( $P < 0.05$ ).

Observou-se que o óleo essencial de *M. alternifolia* reduziu os teores de ergosterol assim como o controle fluconazol. Por outro lado, o tratamento das células com a FrBuOH promoveu redução apenas para *C. tropicalis*, enquanto que para *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* foi notado aumento da quantidade de ergosterol quando comparados com o controle sem tratamento.

Na Figura 27 é possível visualizar o espectro característico de quatro picos do ergosterol para cada espécie de *Candida* sob os diferentes tratamentos e correlacioná-los com o controle das espécies, sem tratamento.

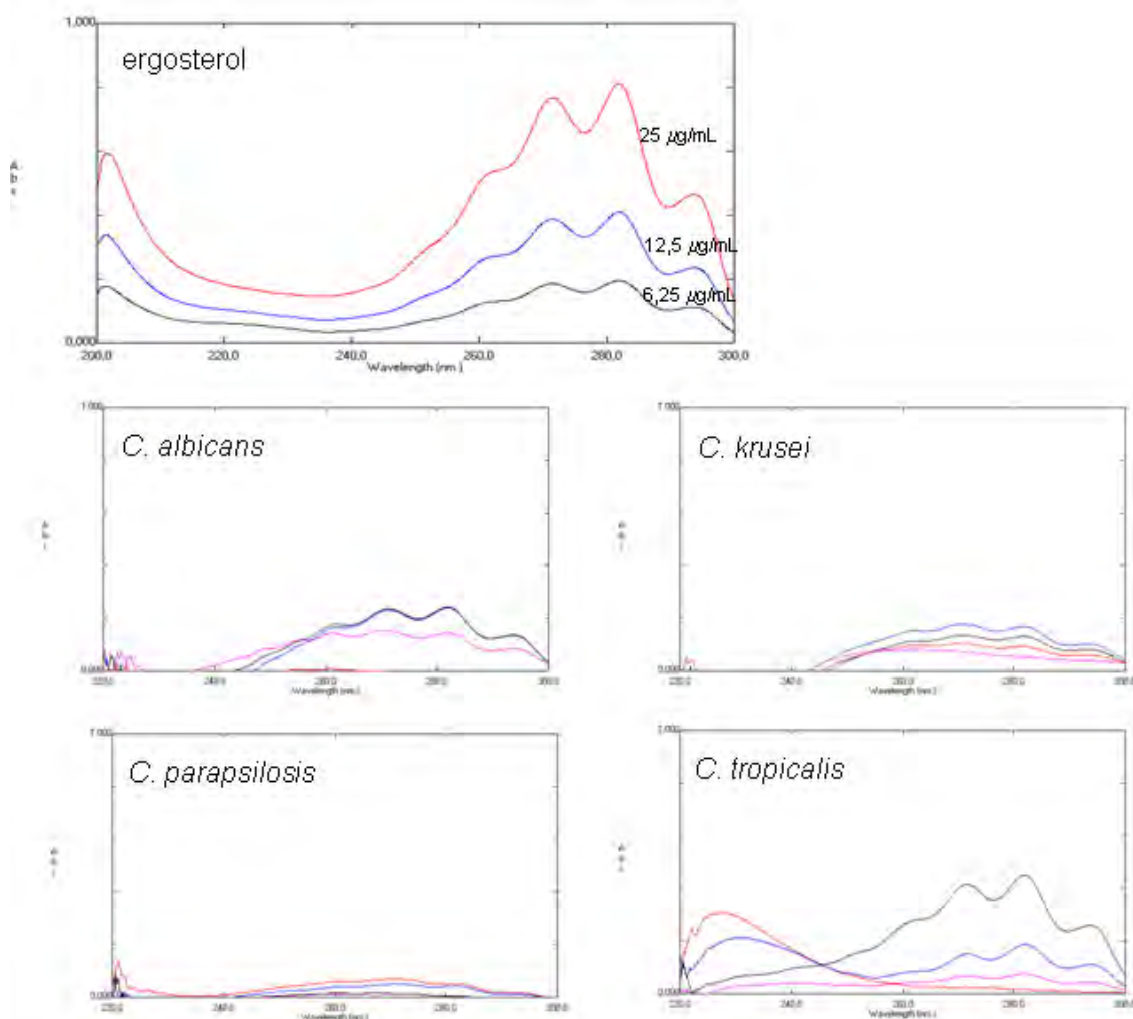


Figura 27: Espectros de ergosterol. Acima, ergosterol puro, adquirido comercialmente, em diferentes concentrações. *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*: em preto, controle sem tratamento; em azul, tratamento com FrBuOH; em vermelho, tratamento com fluconazol; e em rosa, tratamento com o óleo essencial. *C. parapsilosis*: em preto, tratamento com fluconazol; em azul, controle sem tratamento; em vermelho, tratamento com FrBuOH; e em rosa, tratamento com o óleo essencial.

Nos espectros, o tratamento com fluconazol aparece como uma linha plana, sem a presença dos quatro picos característicos de absorvância do ergosterol, mostrando o efeito de redução da síntese desse composto.

Foi interessante notar que *C. parapsilosis* tratada com a FrBuOH e *C. tropicalis* com e sem tratamento apresentaram formação do precursor 24(28)DHE, ocorrendo

aumento do seu conteúdo nas amostras tratadas (exceto para o óleo essencial) em relação ao controle sem tratamento, como pode ser observado na Figura 27.

#### 4.6. Efeitos sobre a parede

##### Efeito protetor do sorbitol

A presença do sorbitol como estabilizador osmótico da parede celular promove aumento do valor de CIM dos compostos que atuam sobre a parede (ESCALANTE et al., 2008). Os valores de CIM para as amostras vegetais do ensaio com adição de sorbitol podem ser observados na Tabela 17.

Tabela 17: Valores de CIM para as amostras vegetais ativas com adição de sorbitol.

Amostras	<i>C. albicans</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. tropicalis</i>	
	CIM <sup>1</sup>	CFM <sup>1</sup>	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
Óleo essencial	0,5	1	1	1	0,5	1	0,06	0,06
EtOH 70	2500	>5000	39	5000	2500	>5000	156	312
FrAcOEt	5000	>5000	39	5000	2500	5000	312	5000
FrBuOH	5000	>5000	39	5000	1250	5000	312	1250
FrAq	5000	>5000	78	5000	2500	5000	1250	2500
Subfr #49-52	1250	>1250	78	1250	625	>1250	312	625
fluconazol	8	32	64	>64	4	16	64	>64
anfotericina	0,25	0,25	1	2	1	2	1	2

1- CIM e CFM para o óleo essencial de *M. alternifolia* estão expressas em %. CIM e CFM para as amostras de *P. cauliflora* estão expressas em µg/mL.

Os valores de CIM para o óleo essencial e para os antifúngicos não foram alterados significativamente quando comparados aos valores de CIM obtidos sem a adição de sorbitol, indicando que essas substâncias não afetam a parede celular. Contudo, as amostras derivadas de *P. cauliflora*, de forma geral, principalmente contra *C. albicans* mas exceto contra *C. tropicalis*, aumentaram em mais de 6x os



valores de CIM, o que é um indício de que os compostos presentes afetam a parede celular para atuarem em algumas das leveduras.

#### Microscopia de fluorescência

Não foi possível observar significativa alteração de intensidade da fluorescência entre as imagens das células tratadas comparadas às não tratadas, para as cinco cepas de *Candida*. Os pontos de maior intensidade de fluorescência foram os das cicatrizes de brotamento, tanto nas células controle como nas células tratadas, indicando a maior concentração de quitina existente nesses locais. Assim, sem alteração significativa da intensidade de fluorescência entre as amostras tratadas e não tratadas, não foi possível inferir alteração dos níveis de quitina nas células com esta metodologia, sendo preciso quantificar sua presença por cromatografia líquida.

#### Microscopia eletrônica de varredura

As fotomicrografias das quatro espécies de *Candida* demonstraram pequenas alterações morfológicas das espécies quando tratadas pelo óleo essencial de *M. alternifolia* e pela FrBuOH do extrato das folhas de *P. cauliflora*. As imagens mais nítidas foram obtidas com as espécies *C. albicans* e *C. krusei*, como apresentado na Figura 28 (aumento: 10000 x).

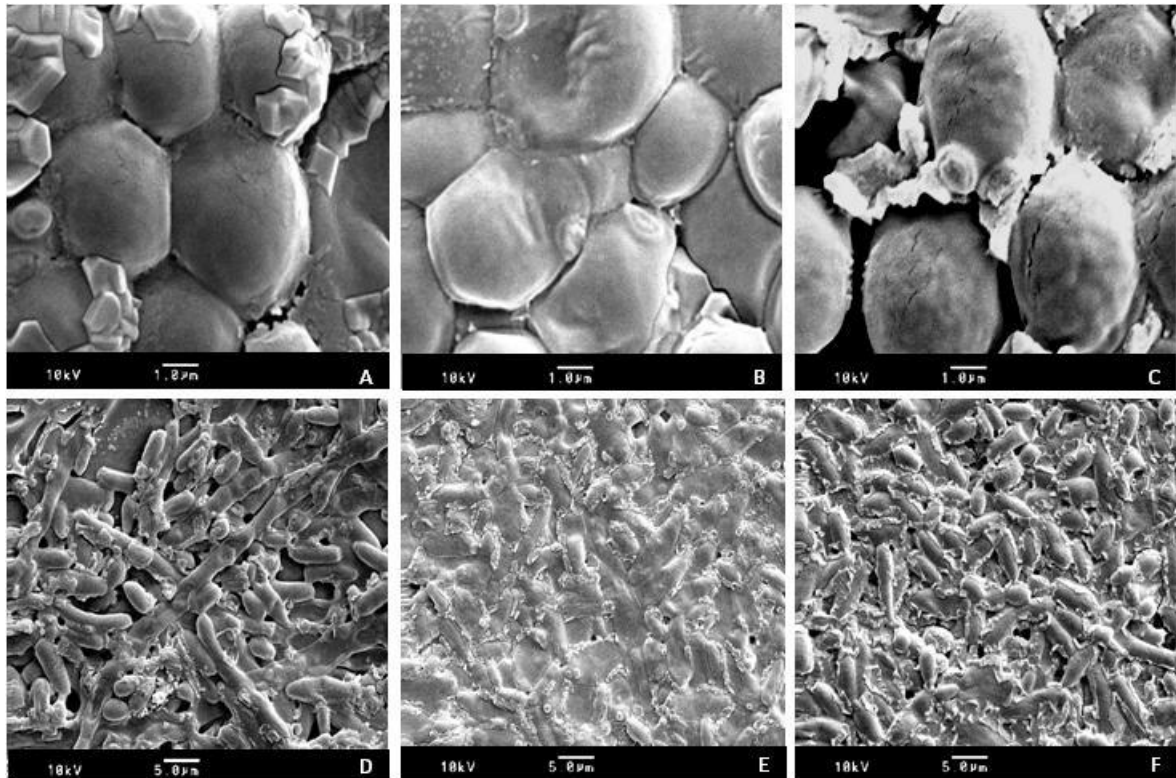


Figura 28: Microscopia eletrônica de varredura das leveduras tratadas e não tratadas. A) *C. albicans* não tratada. B) *C. albicans* tratada com óleo essencial. C) *C. albicans* tratada com FrBuOH. D) *C. krusei* não tratada. E) *C. krusei* tratada com óleo essencial. F) *C. krusei* tratada com FrBuOH. (10000 x)

A cultura de *C. albicans* que não recebeu tratamento mostrou células ovóides de superfície lisa. *C. krusei* também apresentou superfície lisa, contudo sua morfologia tem a característica de ser uma levedura mais alongada. As células de *C. parapsilosis* também são mais alongadas e sua superfície apresentou-se mais rugosa em relação aos outros controles. Por outro lado, com *C. tropicalis* foram evidenciadas as formas ovóides de leveduras e alongadas de hifas, ambas com superfície lisa. De forma geral, quando as células de cada espécie foram tratadas com o óleo essencial, houve uma elevação do número de células observadas que se apresentaram com menor volume de conteúdo celular, mas quando foram tratadas com a FrBuOH, foi reduzido o número de células com a superfície rugosa.

### Microscopia eletrônica de transmissão

Com os ultracortes realizados foi possível comparar a estrutura da parede das células de *C. albicans* SC5314 não tratadas com as células tratadas com o óleo essencial de *M. alternifolia* e com a subFr#49-52. A Figura 29 mostra a estrutura da parede dos diferentes tratamentos (aumento: 130000 x).

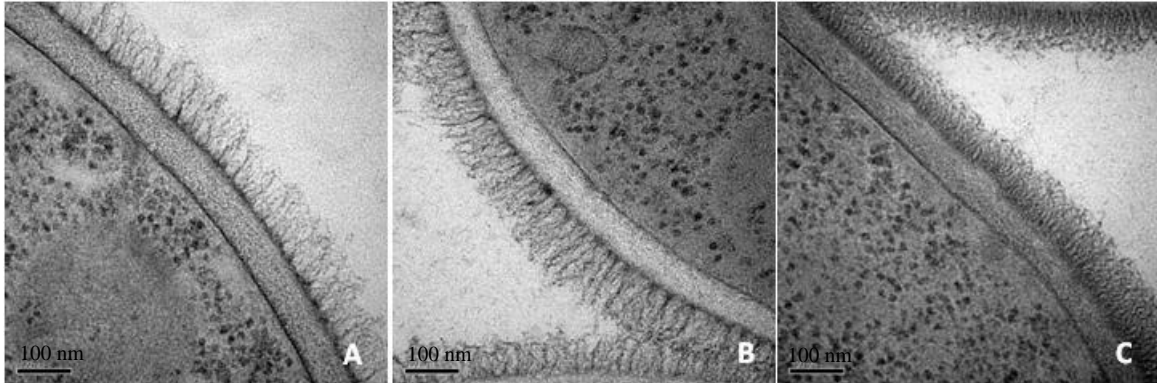


Figura 29: Microscopia eletrônica de transmissão das células de *C. albicans* SC5314. A) Controle sem tratamento. B) Tratamento com óleo essencial de *M. alternifolia*. C) Tratamento com a subFr#49-52. (130000 x)

Analisando a camada mananoproteica observou-se leve aumento da espessura na célula tratada com o óleo, enquanto que o aumento da densidade e encurtamento da mesma camada é evidentemente maior na célula tratada com a sub-fração.

### Quantificação dos açúcares da parede celular

Respectivamente, glicosamina, glicose e manose são os monômeros de açúcar dos polímeros da parede celular de fungos quitina,  $\beta$ -glucana e manana. O doseamento destes açúcares pode indicar alterações da composição da parede. Na Figura 30 estão apresentados os gráficos de composição desses polímeros nas células tratadas, comparadas com o controle sem tratamento, tanto na forma de levedura como na de hifa.

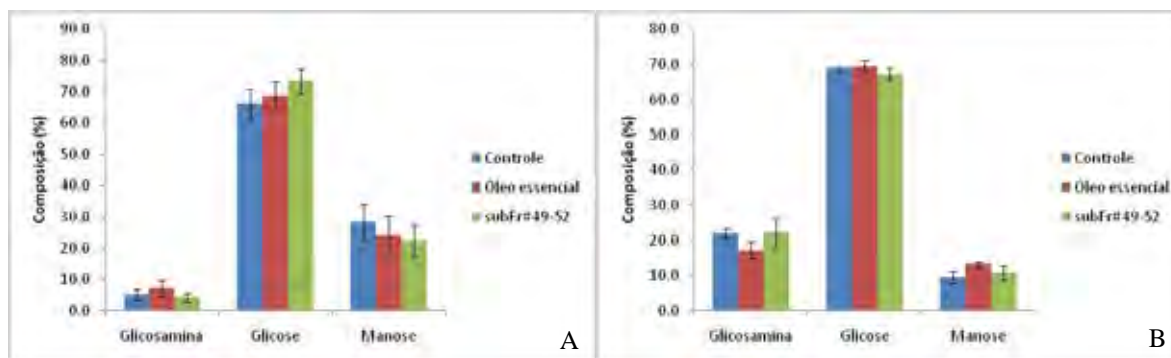


Figura 30: Quantificação dos monômeros de quitina (glicosamina),  $\beta$ -glucana (glicose) e manana (manose) para as células de *C. albicans* SC5314 tratadas com as amostras vegetais. A) Crescimento de células leveduriformes. B) Crescimento de células na forma de hifa.

Quando a célula leveduriforme foi tratada com as amostras com as amostras vegetais, observou-se alterações não significativas, como moderado aumento de glicosamina e de glicose e redução de manose pelo tratamento com o óleo essencial e moderado aumento e redução, respectivamente, de glicose e manose pelo tratamento com a sub-fração. Com este último tratamento, esperava-se aumento de manose, como sugerido pela visualização das células por microscopia de transmissão eletrônica. Contudo, não se pode inferir que óleo essencial ou a subFr#49-52 alteraram a composição da parede celular de *C. albicans* SC5314 na forma de levedura possivelmente não interferindo diretamente nessas moléculas nem na sua via biossintética (KAPTEYN et al., 2000).

Também quando as células foram estimuladas a produzirem hifas, não se observou diferença da composição de sua parede quando tratada com a sub-fração, o que, junto com a não alteração de fluorescência pela coloração específica para manose pode indicar que a maior densidade da camada fibrilar observada pela microscopia eletrônica de transmissão não se deva a alterações do nível de manose.

O que é possível de se observar é que a composição da célula hifal sem tratamento apresenta cerca de 4 vezes mais quitina e quase 3 vezes menos manose que a célula leveduriforme. Ao passo que o óleo essencial de *M. alternifolia*, inibidor da formação de hifas em *C. albicans*, reduz de forma estatisticamente significativa a quantidade de glicosamina, ou seja, quitina e aumenta significativamente, a

composição de manose. O que se observa na Figura 31 é que esta redução e este aumento não ocorrem ao mesmo nível da composição das células leveduriformes sem tratamento, tanto com o tratamento do óleo essencial a 0,03% (reduz o alongamento do filamento em 20% de soro bovino fetal) ou na concentração de 0,12% (inibição total da formação de hifas).

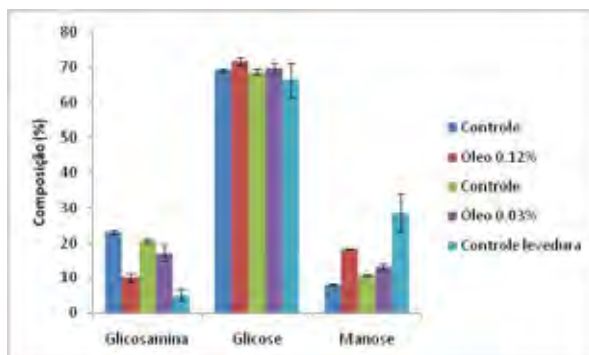


Figura 31: Comparação de quitina (glicosamina),  $\beta$ -glucana (glicose) e manana (manose) entre as células hifais sem tratamento, tratadas com óleo essencial de *M. alternifolia* a 0,12% e a 0,03% com as células leveduriformes sem tratamento (controle).

Assim, a redução de fluorescência das células hifais tratadas com o óleo essencial e coradas com Calcofluor White sugerindo redução dos níveis de quitina foi confirmada pela menor quantidade do monômero glicosamina presente na parede celular.

### Quantificação das proteínas de parede celular

Pelo método de quantificação de proteínas proposto por Bradford em 1976 e utilizado por Mora-Montes et al. (2007), entre outros, pode-se analisar alterações quantitativas, mas não qualitativas, da constituição proteica da parede celular de *C. albicans* SC5314 tratada com o óleo essencial de *M. alternifolia* e com a subFr#49-52 em relação ao controle sem tratamento. A análise pode ser feita comparando o nível de proteínas ligadas aos polímeros de manose, proteínas que contêm ligações dissulfeto e proteínas que não estão ligadas aos constituintes da parede celular (Figura 32).

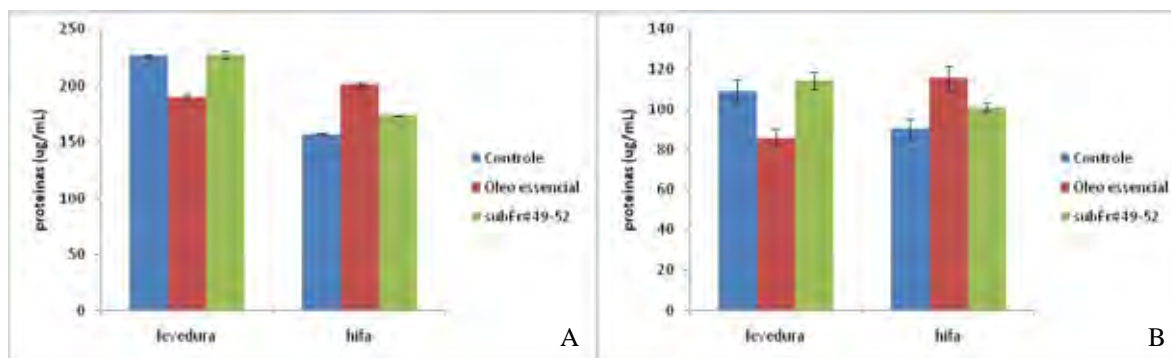


Figura 32: Quantificação das proteínas da parede celular de *C. albicans* SC5314. A) Proteínas não ligadas aos polissacarídeos e as que contêm ligações dissulfeto. B) Proteínas ligadas aos polissacarídeos da parede.

Pela Figura 32 observou-se significativa redução (cerca de 20%) do nível de proteínas das leveduras tratadas com o óleo essencial, indicando a susceptibilidade desta forma, enquanto que ocorreu aumento das proteínas ancoradas aos polissacarídeos na forma filamentosa. Enquanto que a subFr#49-52 alterou significativamente apenas o nível de proteínas ligadas das células em forma de hifa em torno de 10%.

#### Análise de porosidade da parede celular

O controle das células leveduriformes apresentou porosidade relativa da parede celular de 30% na presença dos agentes indutores de extravazamento intracelular, o que está de acordo com a literatura visitada (DE NOBEL et al., 1990). O óleo essencial acompanhou este valor, porém observou-se redução da porosidade da parede celular das células tratadas pela subFr#49-52, como apresentado na Figura 33.

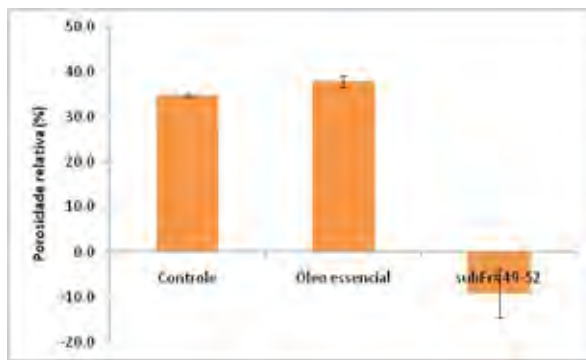


Figura 33: Porosidade relativa da parede celular de *C. albicans* SC5314 comparando controle e diferentes tratamentos.

A camada de mananoproteínas é responsável pelo controle da porosidade da parede celular de leveduras (DE NOBEL et al., 1990) e a redução observada nas células tratadas com a sub-fração enriquecida de taninos confirmou a visualização de maior densidade desta camada. Como não houve alteração da quantidade de manose nas células tratadas com a fração, sugere-se que a atividade desses taninos, deva-se a alterações promovidas em proteínas da parede celular.

## 5. DISCUSSÃO

A constituição fitoquímica das plantas é indicativa de suas possíveis propriedades biológicas, podendo abranger tanto propriedades terapêuticas como tóxicas. A análise da constituição química dos vegetais pode ser baseada apenas na caracterização de grupos de metabólitos secundários que estejam presentes proporcionando o conhecimento do perfil fitoquímico da droga e indicando o grupo de compostos que seja relevante nesta ou a análise pode ser expandida até o isolamento e elucidação estrutural de moléculas (FALKENBERG et al., 2004).

No óleo essencial de *M. alternifolia* existem mais de 100 substâncias e apenas cerca de 10 foram identificadas como sendo majoritárias e principais responsáveis pelas atividades biológicas, como terpinen-4-ol, 1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineol, terpinoleno e  $\alpha$ - e  $\gamma$ -terpineno (CARSON et al., 1998). A análise em cromatografia em camada delgada da amostra do óleo essencial utilizado neste estudo revelou uma diversidade de compostos de derivados terpênicos. Na análise por CG-EM da amostra de óleo essencial de *M. alternifolia*, verificando a massa e o pico-base do íon molecular dos picos obtidos no cromatograma, foi indicada a presença de cerca de 16 substâncias, entre elas, terpinen-4-ol, 1,8-cineol,  $\gamma$ -terpineno, terpineol, *p*-cimeno, aromadendreno, globulol e viridiflorol. Estas substâncias são apresentadas na constituição padronizada ISO 4730 e em outras padronizações do referido óleo essencial (SOUTHWELL et al., 2006) e conferiram a identidade da amostra analisada.

Além da qualidade química verificada, a presença da substância terpinen-4-ol dá suporte aos estudos de atividade antimicrobiana uma vez que este é um dos compostos majoritários tido como principal ativo do óleo essencial de *M. alternifolia* (BUDHIRAJA et al., 1999; BIJU et al., 2005), embora segundo Miller (1984) a eficácia do óleo deva-se à interação de várias substâncias e a atividade do terpinen-4-ol isolado tenha se apresentado menor que a do óleo essencial em seu estudo. Por outro lado, 1,8-cineol, presente na amostra, é estudado como um dos principais compostos responsável por casos de sensibilização ao óleo essencial (BUDHIRAJA et al., 1999) todavia outros terpenos do óleo também o sejam (CARSON et al., 1998) e Hausen et al. (1999) tenham apresentado que o óleo essencial fresco é pouco sensibilizante, mas



que quando exposto à luz, ar e calor, seus compostos oxidados possuem uma capacidade 3 vezes maior de sensibilização.

Após confirmada a composição do óleo essencial de *M. alternifolia* pelo método de difusão em ágar, a determinação dos valores de CIM e de CFM frente às leveduras apresentou-se de acordo com os valores relatados na literatura, ou seja, entre 0,06 a 0,5% (HAMMER et al., 1998; VAZQUEZ et al., 2000; HÁLCÓN e MILKUS, 2004; BAGG et al., 2006), mostrando-se como mais sensível a cepa de *C. tropicalis*. A proximidade dos valores de CIM e CFM do óleo obtidos reafirmaram sua propriedade fungicida já relatada (VAZQUEZ et al., 2000).

A atividade fungicida também pode ser comensurada pela metodologia que avalia o tempo de morte das células submetidas à concentração inibitória mínima (SÓCZÓ et al., 2007). Contudo, para acompanhar a influência do óleo essencial na curva de crescimento das leveduras, foi utilizada uma concentração inferior à concentração inibitória, visto que já se conhece a rapidez de sua ação citocida (MONDELLO et al., 2003). Com isto, conseguiu-se observar que em concentração inferior o óleo essencial promove redução do número de colônias ao longo de 24 h de incubação mas não o suficiente de forma que nessa concentração sub-inibitória o óleo pode ser considerado fungistático.

A concentração citotóxica de inibição de 50% da viabilidade de células da linhagem SIRC para o óleo essencial foi maior que 0,06%, estando na mesma faixa de valores de concentração inibitória mínima contra as cepas de *Candida*. A citotoxicidade do óleo essencial de *M. alternifolia* é relatada para diferentes tipos de células animais e humanas e foi revisada por Hammer et al. (2006). Principalmente ao componente majoritário do óleo, terpinen-4-ol, são atribuídas tanto a atividade antimicrobiana (OLIVA et al., 2003) como a citotóxica (HAMMER et al., 2006), que podem estar relacionadas à propriedade dos terpenos de alterar a fluidez de membranas (COWAN, 1999; HAMMER et al., 2004).

O primeiro resultado deste estudo sobre a composição química das folhas de *P. cauliflora* foi obtido com as reações histoquímicas que, além de apresentarem as características anatômicas características de mirtáceas, também mostrou que as folhas são compostas por lipídeos, incluindo terpenos, nas cavidades secretoras e que os

compostos polares de derivados fenólicos estão concentrados nas nervuras e parênquima paliçádico. Estas reações orientaram o processo de extração das folhas com etanol 70% uma vez que era desejado um solvente de polaridade que permitisse simultaneamente a obtenção dos derivados fenólicos e terpênicos, conhecidamente com atividade antimicrobiana (COWAN, 1999). Assim, a cromatografia em camada delgada do extrato obtido com etanol 70% das folhas confirmou a predominância de derivados terpênicos e fenólicos, com destaque para flavonóides e taninos. A fração obtida com acetato de etila a partir desse extrato concentrou, principalmente, os flavonóides de média polaridade, enquanto que na fração butanólica foram encontrados flavonóides de maior polaridade e taninos e, na fração aquosa, foram concentrados os derivados tânicos mais polares e açúcares. Pelos ensaios espectrofotométricos de quantificação, sugere-se a confirmação de que a FrAcOEt concentrou o maior teor de flavonóides totais, a FrBuOH concentrou o maior teor de fenóis e taninos e observaram-se os menores teores na FrAq, mas deve-se considerar a relativa especificidade destes testes (VERZA et al., 2007).

O aperfeiçoamento do procedimento de análise do perfil fitoquímico por HPLC-UV-DAD do extrato mostrou que o perfil apresentou-se mais completo a partir do “clean up” com o sistema MeOH:H<sub>2</sub>O (8:2; v/v). Por meio da análise dos espectros na região do ultravioleta de cada pico foram verificadas as principais classes de substâncias presentes no extrato das folhas, que são derivados do ácido elágico, do ácido gálico e de flavonóides.

A técnica de cromatografia em coluna proporcionou o isolamento e a identificação de quatro substâncias da FrACOEt: quercetina-3-O- $\beta$ -glicopiranosídeo, quercetina-3-O- $\beta$ -galactopiranosídeo, miricetina-3-O- $\beta$ -galactopiranosídeo e miricetina-3-O- $\beta$ -alopiranosídeo.

Pela cromatografia em contra-corrente de alta velocidade aplicada à FrBuOH obteve-se uma sub-fração com atividade antifúngica semelhante à da fração de origem e a partir desta sub-fração foram otimizadas as condições para separação dos compostos por HPLC-UV-DAD preparativa, resultando em três principais porções. Uma das frações era composta por um pico único cuja substância isolada foi identificada como casuarinina, um tanino hidrolizável derivado do ácido elágico

(elagitanino), já isolada primeiramente de espécies do gênero *Casuarina*, família Casuarinaceae (OKUDA et al., 1983), mas também já encontrada na família Myrtaceae (BARRY et al., 2001).

O trabalho de Reynertson et al. (2006) identificou a presença de quercetina e derivados, rutina, miricetina, cumarinas, ácidos fenólicos, ácido gálico, ácido elágico, entre outros compostos em frações de extrato metanólico dos frutos de *P. cauliflora*. Estes dados associados ao do presente estudo mostram uma congruência de resultados e contribuem para o conhecimento da espécie, favorecendo a busca de novos agentes terapêuticos.

Os principais compostos presentes nos extratos, frações e sub-frações, ou seja, flavonóides e taninos, são reconhecidos na literatura por apresentarem propriedades antimicrobianas (COWAN, 1999; KOLODZIEJ et al., 1999; HERNÁNDEZ et al., 2000; DALL'AGNOL et al., 2003; CHOI et al., 2006). Com o teste de difusão em ágar foi observado que as amostras de *P. cauliflora* testadas apresentam atividade antimicrobiana para as quatro espécies de *Candida* em teste e, portanto, a determinação da concentração inibitória mínima foi realizada pelo método de microdiluição sugerido por Eloff (1998), seguindo a Norma 27-A2 do NCCLS (2002), atual CLSI, uma vez que por este método o teste pode ser realizado com menor quantidade de amostra, possibilitando avaliação mais rápida de um maior número de amostras, possuindo maior sensibilidade e reprodutibilidade (OSTROSKY et al., 2008). Entre as amostras de *P. cauliflora* analisadas, o extrato e a FrBuOH apresentaram os menores valores de CIM. Contudo, os valores de CFM foram mais elevados que os valores de CIM, indicando que a atividade pode ser fungistática, mas não fungicida. A sub-fração #49-52 apresentou valores de CIM relativamente baixos, o que a tornou um agente antifúngico potencial e, portanto, foi submetida a processo de purificação a fim de identificar sua constituição. O composto majoritário dessa sub-fração, casuarinina, apresentou melhor atividade contra *C. krusei*, cepa utilizada como controle de qualidade de antifúngicos (CHATURVEDI et al., 2008), apresentando uma atividade média contra as demais espécies testadas. No trabalho de Kuete et al. (2007) outros derivados do ácido elágico mostraram valores de CIM contra *C. albicans* semelhantes às frações e sub-frações do presente estudo, mas não

foi encontrada descrição na literatura de atividade da molécula casuarinina contra espécies de *Candida*.

Entretanto, observou-se que houve redução da atividade antifúngica para o composto isolado e para os dois demais grupos de compostos separados dessa sub-fração. Por outro lado, o composto majoritário e as demais frações purificadas com ele não indicaram atividade sinérgica entre eles e, desta forma, a perda de atividade não pode ser explicada pelo sinergismo entre os compostos da subFr#49-52. Dados da literatura mostram que os taninos hidrolizáveis são facilmente hidratados e que sua estabilidade é dependente de sua estrutura, sendo favorável a quebra das ligações éster pelas moléculas de água presentes nessa hidratação (YOSHIDA et al., 2000).

Nem sempre uma planta que possui determinada atividade possui um único composto ativo. *Plinia glomerata*, espécie frutífera do mesmo gênero da *P. cauliflora*, que tem em sua composição química os taninos ácido 3,4,3'-trimetóxi-flavelágico-4'-O-glicosídeo e ácido 3,4,3'-trimetóxi-flavelágico, apresenta atividade antibacteriana nos testes com extrato e frações polares das folhas e cascas, mas a mesma é perdida quando avaliada para esses compostos isolados (SERAFIN et al., 2007). A purificação das frações do extrato das folhas de *P. cauliflora* foi realizada de forma biomonitorada, assim, foram feitos fracionamentos das amostras que se mostravam ativas a fim de encontrar um ou mais compostos responsáveis pela atividade antifúngica. Ao fracionar a sub-fração ativa (#49-52) a atividade anti-*Candida* foi reduzida e, por isso, sugere-se que essa atividade deva-se à sub-fração, mas levando à perda da atividade quando seus compostos são purificados.

A atividade antifúngica do óleo essencial de *M. alternifolia* contra cepas de isolados clínicos está descrita em trabalhos como o de Oliva et al. (2003), mas a atividade apresentada pelo extrato etanólico de *P. cauliflora*, fração butanólica e algumas outras frações contra a cepa de *C. albicans* SC5314 corrobora com a atividade antifúngica dessas amostras contra candidíases.

A FrBuOH não promoveu nenhuma alteração na curva de crescimento comparada com a curva das células que não receberam tratamento. Assim como

fluconazol, confirmou-se que a fração é fungistática no valor de sua concentração inibitória mínima.

Além de avaliar a eficácia, procurou-se verificar a segurança do extrato, das frações e alguns isolados frente a células fibroblásticas da linhagem SIRC, que é preconizada pela ANVISA em um dos ensaios de irritação (ANVISA, 2003) uma vez que os testes “in vitro” com células animais ou humanas são uma das potenciais alternativas aos testes de toxicidade com animais (HAMMER et al., 2006).

A FrAcOEt mostrou maior citotoxicidade, com CC50 de 125 a 250 µg/mL e, por conseguinte, a sub-fração #201-205, composta pela mistura de dois glicosídeos de quercetina, teve CC50 de 200 µg/mL. O extrato apresentou citotoxicidade de 50% de inibição da viabilidade celular a partir de 250 µg/mL, a FrBuOH a partir de 500 µg/mL e os isolados não apresentaram citotoxicidade na maior concentração testada (acima de 100 µg/mL).

De um lado, o resultado de citotoxicidade das moléculas de quercetina foi congruente com a literatura, já que a quercetina pode ser considerada um agente quimioterápico devido à sua ação antiproliferativa, com o déficit de ter baixa potência e não ter especificidade entre a célula saudável e a de câncer (PALIWAL et al., 2005), contudo, sem relatos de apresentar atividade antifúngica, assim como neste estudo. Por outro lado, para derivados do ácido elágico isolados de extrato metanólico das cascas de *Elaeocarpus mastersii* foi verificado que apresentam fraca atividade citotóxica (ITO et al., 2002), o que corrobora com o presente estudo de busca de compostos de baixa citotoxicidade para uso como agentes anti-*Candida*, como no caso das frações contendo derivados do ácido elágico purificadas a partir da subFr#49-52.

Por ser a princípio comensal, a patogenicidade de *Candida* depende de diversas características, como seus fatores de virulência, reconhecimento do hospedeiro, mecanismos de defesa do hospedeiro, e/ou susceptibilidade para infecções tecido-específicas. Na superfície das mucosas, a levedura depende da ação de enzimas hidrolíticas e proteolíticas e do reconhecimento e ligação ao hospedeiro por adesinas (geralmente proteínas glicosiladas). A mucosa pode favorecer a invasão da célula leveduriforme englobando-a por fagocitose. Por outro lado, o próprio

patógeno pode favorecer sua invasão pela formação de tubo germinativo a partir do blastoconídeo aderido através do epitélio da mucosa (CALDERONE e FONZI, 2001; CHAUHAN et al., 2006). Atingindo a corrente sanguínea, o gênero *Candida* se difunde para órgãos como os rins, crescendo tanto na forma de hifa como de pseudo-hifa (CHAUHAN et al., 2006). Além de proporcionar a invasão, a célula na forma de hifa tem a propriedade de não ser reconhecida por algumas citocinas do sistema imune inato, o que favorece a colonização (NETEA et al., 2008).

Hammer et al. (1996) mostraram que a anfotericina B previne a transformação da morfologia de *C. albicans* de levedura para hifa, enquanto que os azóis apresentaram menor capacidade de inibição. No presente estudo, reafirmou-se o dado de Hammer et al. e tendo como controle do ensaio o resultado com anfotericina B, foi possível observar que o óleo essencial de *M. alternifolia* e a FrBuOH inibiram a alteração da forma de levedura para hifa, pseudo-hifa ou formação de tubo germinativo em *C. tropicalis*. Confirmou-se também o resultado de Hammer et al. (2000) quanto à inibição total da formação de hifa em *C. albicans* tratada com 0,25% do óleo essencial de *M. alternifolia*, o que pode estar associado com a alteração de permeabilidade de membranas causada pelos terpenos, levando também a alterações das funções associadas a membranas como inibição da via respiratória na membrana mitocondrial. O óleo em concentração 0,03% manteve a inibição da formação de hifa em meio de cultura de Lee e em soro bovino fetal ele reduziu o desenvolvimento do filamento. Foi possível observar que embora a sub-fração #49-52 não iniba completamente a formação de hifas, ela proporciona redução do comprimento do filamento em meio com soro bovino fetal, mas não em meio de Lee. Esta propriedade de inibição da formação de hifa deveria ser comprovada para ambas as amostras com testes em mutante constitutivo para a formação de filamento visto que é um fator importante no controle da invasividade das infecções por estes patógenos.

Quanto ao mecanismo de ação, o antifúngico anfotericina B possui tal estrutura molecular que permite o reconhecimento das moléculas de ergosterol presentes na membrana plasmática da levedura, ligando-se a elas e como consequência se alocando em um plano perpendicular à membrana, abrindo grandes poros na parede (VICENTE e PELÁEZ, 2007). Para verificar se o mecanismo de ação

das amostras vegetais ativas tinha relação com a ligação às moléculas de ergosterol, adicionou-se ergosterol exógeno às microplacas de determinação de CIM, o que em caso positivo seria verificado pelo aumento da CIM (LEE et al., 1999). O óleo essencial de *M. alternifolia* não apresentou alteração do valor de CIM, indicando não se ligar a estas moléculas enquanto que as amostras obtidas a partir das folhas de *P. cauliflora* tiveram aumento no valor de CIM o que é indicativo de ligação de seus compostos ao ergosterol adicionado ao meio.

Já o fluconazol atua em fungos filamentosos e leveduras por inibir a enzima lanosterol 14- $\alpha$ -demetilase do complexo P450 e isto leva à inibição da conversão de lanosterol em ergosterol, reduzindo a formação deste, acumulando seus precursores e fazendo com que haja perda da integridade da membrana (VICENTE e PELÁEZ, 2007). Assim, pelo método de quantificação de ergosterol foi avaliado se as amostras alterariam a quantidade de ergosterol das leveduras. Houve significativa redução do conteúdo de ergosterol das espécies de *Candida* tratadas com fluconazol, mas não significativa redução quando tratadas com o óleo essencial. Entretanto, o tratamento das cepas com a FrBuOH promoveu aumento do conteúdo de ergosterol. Para as duas amostras vegetais não se conseguiu identificar se o efeito observado ocorre por alteração da biossíntese ou por outro mecanismo. O que se conhece é que o óleo essencial de *M. alternifolia* propicia o aumento da permeabilidade e fluidez da membrana celular de *C. albicans* (HAMMER et al., 2004), fato que se deve à inserção de terpenos entre as cadeias lipídicas da membrana, alterando sua estrutura e assim promovendo as mudanças nas propriedades e funções (SIKKEMA et al., 1995). Os trabalhos de Sikkema et al. (1995) e de Hammer et al. (2004) não fazem citações quanto à quantificação do ergosterol da membrana o que se pode supor por este presente estudo que se trata de um efeito secundário às alterações que ocorrem na membrana.

Não só a membrana, mas também a parede das leveduras é considerada um alvo de agentes antifúngicos. Essa parede celular já foi considerada como uma estrutura quase inerte com duas funções: rigidez e proteção ao protoplasto. Contudo, sabe-se que ela é essencial em muitos aspectos da biologia e patogenicidade (CHAFFIN et al., 1998; CHAFFIN, 2008). É a parede que atua como barreira, mantém

a forma característica e media a interação física inicial entre o fungo e o ambiente, inclusive o hospedeiro (CHAFFIN et al., 1998).

Uma característica de inibidores da síntese e arranjo da parede celular de fungos é que sua atividade torna-se reduzida em um meio de cultura contendo um estabilizador osmótico como o sorbitol (ESCALANTE et al., 2008). Se por um lado, o óleo essencial de *M. alternifolia* não teve alteração do valor de CIM, indicando não atuar na parede celular das espécies de *Candida*, por outro, as amostras de *P. cauliflora* apresentaram valores maiores de CIM, indicando que seu efeito é dependente de alteração da osmolaridade do ambiente para as células.

Calcofluor white é um sal dissódico do ácido 4,4'-bis-[4-anilino-bis-dietil-amino-S-triazin-2-ilamino]-2,2'-etilbeno-dissulfônico que se une às ligações  $\beta$  1-3 e  $\beta$  1-4 de polissacarídeos, como quitina, exibindo fluorescência branco azulada quando exposto à radiação ultravioleta. Tal seletividade por quitina permite visualizar a parede de fungos e estimar a redução ou o aumento de sua espessura (KUMAR et al., 2009).

Aplicando esta técnica, não foi possível visualizar alteração da parede das células de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* em relação às controles quando tratadas com o óleo essencial de *M. alternifolia*, com a subFr#49-52 e com o composto isolado desta. Este resultado é indicativo de que as amostras podem não atuar por alteração da concentração de quitina da parede celular.

Por microscopia eletrônica de varredura torna-se possível visualizar a ultraestrutura da superfície de células (OSUMI, 1998). Aplicando esta técnica às quatro espécies em teste, tratadas com as amostras vegetais e não tratadas, observou-se aumento da rugosidade da superfície das primeiras em relação às controle, além de um efeito de extravazamento de conteúdo das células. Por alterar a permeabilidade da membrana celular (HAMMER et al., 2004) as células tratadas com o óleo essencial sofrem extravazamento do seu conteúdo. Por outro lado, os efeitos observados pela microscopia para as células tratadas com as amostras de *P. cauliflora* podem estar relacionados com a instabilidade osmótica promovida. O efeito de aumento da rugosidade é indicativo de alterações na célula da levedura e já foi observado por microscopia eletrônica de varredura para células de *C. albicans*



tratadas com miconazol, inibidor da produção de ergosterol (NOLLIN e BORGERS, 1975) e com o antifúngico mulundocandina, inibidor da produção de glucana, que também promoveu distorção e encurtamento das células (BRUNEAU et al., 2003).

Por microscopia eletrônica de transmissão há algum tempo já é possível observar a ultraestrutura das células de *C. albicans* e visualizar alterações que possam ocorrer na presença de algum agente (CASSONE et al., 1979; TOKUNAGA et al., 1986; NETEA et al., 2006). O tratamento das células leveduriformes de *C. albicans* SC5314 com o óleo essencial de *M. alternifolia* causou pouca alteração visível por microscopia eletrônica de transmissão na estrutura da parede celular. Por sua vez, a subFr#49-52 promoveu adensamento e encurtamento da camada mais externa da parede, constituída de mananoproteínas, que tanto pode ser devida a uma alteração da composição/estrutura dos polímeros de manose ou das proteínas.

A parede celular das espécies de *Candida* é formada por uma camada mais externa e fibrilar de mananoproteínas, ou seja, proteínas ligadas a polímeros de manose (30%). A camada mais interna é mais rígida e composta de uma matriz estrutural de quitina (<10%) e  $\beta$ -glucana (~60%). As proteínas presentes na parede celular podem estar ligadas covalentemente ou não aos polímeros de  $\beta$ -glucana da camada interna. As proteínas ligadas (“ancoradas”) à  $\beta$ -glucana geralmente estão envolvidas no desenvolvimento, estrutura e manutenção da parede celular, enquanto que as proteínas dispersas por entre a parede ou secretadas tem as mais diversas funções enzimáticas ou estão relacionadas à virulência do patógeno (CHAFFIN, 2008).

Células de *C. albicans* na forma hifal contêm cerca de 3 vezes mais quitina e similar quantidade de glucana (CHAFFIN et al., 1998). As células que não receberam nenhum tratamento apresentaram semelhante aumento de quitina. Por outro lado, a quantificação de glicosamina em *C. albicans* tratada com o óleo essencial de *M. alternifolia* indicou significativa redução de quitina nas células induzidas a produzirem hifa, o que reforça a propriedade de inibição da produção de hifas pelo tratamento com o óleo. Pelos artigos, observa-se que mutantes nulos para a produção de um desses compostos ou células expostas a agentes que atuam na via biossintética de um dos polímeros de parede podem aumentar o nível de outro polímero como

mecanismo de defesa (KAPTEYN et al., 2000; STEVENS et al., 2006; MORA-MONTES et al., 2007), o que possa vir a explicar o aumento de manose na célula hifal tratada. Quanto à composição proteica, o óleo essencial promoveu significativa redução do nível de todas as proteínas de parede na levedura e aumento das proteínas não ligadas aos polissacarídeos nas células estimuladas a produzirem hifa, indicando a susceptibilidade da espécie ao óleo essencial levando a alterações do conteúdo de proteínas.

A subFr#49-52 não alterou significativamente a composição de polissacarídeos da parede celular de *C. albicans* nem na forma de levedura nem de hifa, em contraposição com o adensamento visualizado da camada de mananoproteína, embora possa ser levado em consideração que também houve um encurtamento em relação à camada da célula sem tratamento. Outra possibilidade para explicar o aumento da densidade seria um aumento da constituição de proteínas da parede celular. Contudo, o mesmo foi observado somente quanto às proteínas ancoradas da célula filamentosa. Analisando esses dados, verificou-se que não houve interferência na formação dos polímeros e das proteínas bem como não ocorreu uma reação paradoxal de estresse que levasse ao aumento de um destes compostos quando a espécie foi tratada com a sub-fração de taninos.

Para complementar o estudo quanto às alterações da parede celular de *C. albicans*, as células tratadas e não tratadas com as amostras vegetais foram colocadas na presença de dois policátions de tamanho definido que têm a propriedade de passar pelos poros da parede celular e interagir com a membrana plasmática de tal forma que sua permeabilidade é alterada e ácidos nucleicos e enzimas são liberados para o meio. A porosidade da parede celular de leveduras é determinada pela camada de mananoproteínas e por isto este teste foi importante para indicar a atuação das amostras vegetais na parede. Embora o óleo essencial de *M. alternifolia* tenha alterado a constituição de polissacarídeos e proteínas da parede celular de *C. albicans*, o que indicou estar relacionado à inibição da formação de hifa, ele não alterou a estrutura celular de forma a alterar a camada de mananoproteínas e então aumentar ou reduzir a porosidade da célula aos policátions. Entretanto, foi nitidamente significativa a alteração da sensibilidade das células aos policátions

quando tratadas com a subFr#49-52. O tratamento reduziu drasticamente a sensibilidade, reduzindo a porosidade da parede celular e inibindo a liberação de material do interior da célula absorvente de luz ultravioleta.

Como observado pela microscopia eletrônica de transmissão, o aumento da densidade da camada de mananoproteínas pode ter sido responsável por essa redução da porosidade e, tendo em vista que não houve alteração dos níveis de carboidratos e proteínas da parede celular, mas conhecendo-se a propriedade de complexação de taninos a proteínas e açúcares, inespecificamente (ISHIDA et al., 2006), pode-se sugerir que os efeitos observados deveram-se à complexação destes com as proteínas presentes na camada mais externa da parede. Uma vez complexadas e precipitadas com os taninos, algumas enzimas podem ser inibidas, alterando o desenvolvimento das células (ISHIDA et al., 2006; BUZZINI et al., 2008; SHER, 2009).

Hemaiswarya et al. (2008) alegaram que as plantas produzem uma grande variedade de pequenas moléculas potencialmente antibióticas da classe dos terpenos, glicoesteróis e polifenóis. Contudo, sua atividade é fraca em comparação com os antibióticos produzidos por bactérias e fungos, sendo que aparentemente combatem as infecções vegetais por meio de sinergismo. Assim, a atividade antimicrobiana apresentada por algumas espécies vegetais pode dever-se à atuação de seus compostos ativos por meio de diferentes mecanismos, o que se torna uma contribuição para evitar o desenvolvimento de resistência (BARBOUR et al., 2004; MOTHANA e LINDEQUIST, 2005). O isolamento de um composto, por sua vez, pode ser de grande importância para a indústria farmacêutica, mas pode significar a perda da atividade (HEMAISWARYA et al., 2008).

Desta forma, foi verificado que o óleo essencial de *M. alternifolia*, composto por dezenas de moléculas, possui atividade fungicida sobre *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* por alterar a permeabilidade da membrana (CARSON et al., 2006) inibiu a formação de hifas e pseudo-hifas em *C. albicans* e *C. tropicalis* promovendo um secundário efeito de redução de ergosterol e indicando alterar a composição da parede celular de *C. albicans* principalmente quando estimulada pelo meio a produzir hifa.

A fração que, de forma geral, apresentou melhor atividade contra as quatro espécies de *Candida* testadas foi obtida da fração butanólica do extrato das folhas de *P. cauliflora* e dela foi isolado um composto majoritário que pode ser utilizado para identificação da fração. A FrBuOH e a subFr#49-52, concentrada em taninos, indicaram ser fungistáticos, mas não fungicidas, reduzir a formação de hifas e pseudo-hifas em *C. albicans* e *C. tropicalis*, ligarem-se a moléculas de ergosterol e terem sua atividade reduzida na presença de protetor osmótico sem, contudo, alterarem a constituição da parede das leveduras. Ao mesmo tempo, os taninos promoveram redução da porosidade da parede celular provavelmente por se complexarem a proteínas da parede o que pode vir a inibir a atuação dessas. Verificou-se, portanto, que podem atuar em *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* por mais de um mecanismo o que auxilia a evitar a resistência por tais micro-organismos.

## 6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos foi possível inferir que:

- ✓ A composição química do óleo essencial de *M. alternifolia* foi identificada, com a presença de vários derivados terpênicos.
- ✓ Caracterização anatômica de metabólitos secundários presentes nas estruturas foliares de *P. cauliflora* feita por estudo histoquímico.
- ✓ A constituição do perfil cromatográfico do extrato EtOH 70 das folhas de *P. cauliflora* indicou, principalmente, a presença de derivados de flavonóides, de ácido elágico e de ácido gálico.
- ✓ Da FrAcOEt foram isoladas quercetina e miricetina.
- ✓ A FrBuOH apresentou melhor atividade antifúngica e, por meio de estudo biomonitorado, foi determinada a sub-fração com melhor atividade, da qual foi isolado o composto majoritário casuarinina.
- ✓ Quantitativamente, a FrAcOEt concentrou os flavonóides e a FrBuOH, fenóis e taninos.
- ✓ O óleo essencial confirmou sua atividade fungicida e pode atuar como inibidor da capacidade de invasão das leveduras por inibição da formação de hifas e da constituição da parede celular de levedura e hifa.
- ✓ A concentração citotóxica do óleo essencial de *M. alternifolia* em fibroblastos está próxima ao seu valor de concentração inibitória mínima contra as espécies de *Candida*.
- ✓ As amostras ativas de *P. cauliflora* (FrBuOH e subFr #49-52) foram fungistáticas, atuaram como inibidoras do desenvolvimento de hifas e indicaram atuar por ligação ao ergosterol e às proteínas de parede celular, alterando seu arranjo.
- ✓ A concentração citotóxica das amostras ativas obtidas do extrato das folhas de *P. cauliflora* é semelhante ou superior ao valor de concentração inibitória mínima contra as espécies de *Candida*.

O óleo essencial de *M. alternifolia* tem excelente atividade por ser fungicida, levando a alterações em ergosterol e também na parede celular, mas não é específico para células de levedura pois apresenta citotoxicidade.

Principalmente a sub-fração #49-52 do extrato etanólico das folhas de *P. cauliflora*, rica em casuarinina, é fungistática, atuando por meio de alteração na parede celular de *Candida*. Indica ser segura pois não apresentou-se citotóxica.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADAMS, R.P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy**. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2001.

AGRAWAL, P.K. **Carbon 13 of Flavonoids**. New York: Elsevier, 1989.

ALMEIDA, R.B.A.; CARRETTO, C.F.P.; SANTANA, R.S. et al. Atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf sobre *Candida* spp. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 37, n. 2, p. 147-153, 2008.

ALVES, P.M.; QUEIROZ, L.M.G.; PEREIRA, J.V. et al. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica in vitro de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 222-224, 2009.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. 2003. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Acesso em: 13 de setembro de 2008.

APTED, J.H. Contact dermatitis associated with the use of tea tree oil. **The Australasian Journal of Dermatology**, v. 32, p. 177, 1991.

ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; LEE-YANG, W.; CIBLAK, M.A. et al. Comparison of Visual and Spectrophotometric Methods of Broth Microdilution MIC End Point Determination and Evaluation of a Sterol Quantitation Method for In Vitro Susceptibility Testing of Fluconazole and Itraconazole against Trailing and Nontrailing *Candida* Isolates. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2477-2481, 2002.

BAGG, J.; JACKSON, M.S.; SWEENEY, M.P. et al. Susceptibility to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil of yeasts isolated from the mouths of patients with advanced cancer. **Oral Oncology**, v. 42, p. 487-492, 2006.

BAIXENCH, M.T.; AOUN, N.; DESNOS-OLLIVIER, M. et al. Acquired resistance to echinocandins in *Candida albicans*: case report and review. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 1076-1083, 2007.

BANES-MARSHALL, L.; CAWLEY, P.; PHILLIPS, C.A. In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against bacterial and *Candida* spp. isolates from clinical specimens. **British Journal of Biomedical Science**, v. 58, p. 139-145, 2001.

BARBOUR, E.K.; AL SHARIFA, M.; SAGHERIANA, V.K. et al. Screening of selected indigenous plants of Lebanon for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 1-7, 2004.

BARROS, R.S.; FINGER, F.L.; MANGALHÃES, M.M. Changes in nonstructural carbohydrates in developing fruit of *Myrciaria jaboticaba*. **Scientia Horticulturae**, v. 66, p. 17-22, 1996.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; COSTA, C. G. et al. **Sistemática das angiospermas**. Viçosa: Imprensa Universitária, v. 2, 1991.

Barry, k.m.; Davies, n.w.; Mohammed, c.l. Identification of Hydrolysable Tannins in the Reaction Zone of *Eucalyptus nitens* Wood by High Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionisation Mass Spectrometry. **Phytochemical Analysis**, v. 12, p. 120–127, 2001.

BARTEK, M.J.; LABUDDE, J.A.; MAIBACH, H.I. Skin permeability in vivo: comparison in rat, rabbit, pig and man. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 58, p. 114-123, 1972.



BENGER, S.; TOWNSEND, P.; ASHFORD, R.L.; LAMBERT, P. An in vitro study to determine the minimum inhibitory concentration of *Melaleuca alternifolia* against the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **The Foot**, v. 14, p. 86-91, 2004.

BENZA, J.C. **143 Frutales Nativos**. Peru: Universidade Nacional Agrária La Molina, 1980.

BERMAN, J. Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 595-601, 2006.

BIJU, S.S.; AHUJA, A.; RAFIULLAH, M.R.M. et al. A validated HPTLC method for determination of tea tree oil from cosmeceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, p. 41-44, 2005.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemist**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAUN, B.R.; JOHNSON, A.D. Control of Filament Formation in *Candida albicans* by the Transcriptional Repressor TUP1. **Science**, v. 277, n. 5322, p. 105-109, 1997.

BRILHANTE, R.S.; CORDEIRO, R.A.; MEDRANO, D.J. Onychomycosis in Ceara (Northeast Brazil): epidemiological and laboratory aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 131-135, 2005.

BROPHY, J.J.; DAVIES, N.W.; SOUTHWELL, I.A.; STIFF, I.A.; WILLIAMS, L.R. Gas chromatographic quality control for oil of *Melaleuca terpinen-4-ol* type (Australian tea tree). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, p. 1330-1335, 1989.

BRUNEAU, J.M.; MAILLET, I.; TAGAT, E. et al. Drug induced proteome changes in *Candida albicans*: Comparison of the effect of  $\beta$ -(1,3)-glucan synthase inhibitors and two triazoles, fluconazole and itraconazole. **Proteomics**, v. 3, p. 325-336, 2003.

BUCK, D.S.; NIDORF, D.M.; ADDINO, J.G. Comparison of two topical preparations for the treatment of onychomycosis: *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and clotrimazole. **The Journal of Family Practice**, v. 38, p. 601-605, 1994.

BUDHIRAJA, S.S.; CULLUM, M.E.; SIOUTIS, S.S. et al. Biological activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil component, terpinen-4-ol, in human myelocytic cell line HL-60. **Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics**, v. 22, p. 447-453, 1999.

BUZZINI, P.; ARAPITSAS, P.; GORETTI, M. et al. Antimicrobial and Antiviral Activity of Hydrolysable Tannins. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 12, p. 1179-1187, 2008.

CAIN, A.J. The use of Nile Blue in the examination of lipids. **The Quarterly journal of microscopical science**, v. 88, p. 383-392, 1947.

CALDERONE, R.A.; FONZI, W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. **TRENDS in Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 327-335, 2001.

CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Letters of Applied Microbiology**, v. 16, p. 49-55, 1993.

CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **The Journal of Applied Bacteriology**, v. 78, p. 264-269, 1995.

CARSON, C.F.; HAMMER, K.A.; RILEY, T.V. Broth micro-dilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Microbios**, v. 82, p. 181-185, 1995.

CARSON, C.F.; HAMMER, K.A.; RILEY, T.V. *In-vitro* activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* against *Streptococcus* spp. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 37, p. 1177-1178, 1996.

CARSON, C.F.; RILEY, T.V. **Antimicrobial activity of tea tree oil**. Nedlands, Australia: Rural Industries Research and Development Corporation, 1998.

CARSON, C.F.; RILEY, T.V.; COOKSON, B.D. Efficacy and safety of tea tree oil as a topical antimicrobial agent. **Journal of Hospital Infection**, v. 40, p. 175-178, 1998.

CARSON, C.F.; MEE, B.J.; RILEY, T.V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 46, p. 1914-20, 2002.

CASSONE, A.; KERRIDGE, D.; GALE, E.F. Ultrastructural Changes in the Cell Wall of *Candida albicans* Following Cessation of Growth and their Possible Relationship to the Development of Polyene Resistance. **Journal of General Microbiology**, v. 110, p. 339-349, 1979.

CASTRO, C.; SILVA, M.L.; PINHEIRO, A.L. et al. Análise econômica do cultivo e extração do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Revista Árvore**, v. 29, n. 2, p. 241-249, 2005.

CHAFFIN, W.L.; LÓPEZ-RIBOT, J.L.; CASANOVA, M. et al. Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans*: Identification, Function, and Expression. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 1, p. 130-180, 1998.

CHAFFIN, W.L. *Candida albicans* Cell Wall Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 3, p. 495-544, 2008.

CHATURVEDI, V.; RAMANI, R.; GHANNOUM, M.A. et al. Multilaboratory Testing of Antifungal Combinations against a Quality Control Isolate of *Candida krusei*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1500-1502, 2008.

CHAUHAN, N.; LATGE, J.P.; CALDERONE, R. Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Nature Reviews/Microbiology**, v. 4, p. 435-444, 2006.

CHOI, Y.M.; NOH, D.O.; CHO, S.Y. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. **LWT** v. 39, p. 756-761, 2006.

CHRISTOPH, F.; KAULFERS, P.M.; STAHL-BISKUP, E. A comparative study of the in vitro antimicrobial activity of tea tree oils s.l. with special reference to the activity of beta-triketones. **Planta Medica**, v. 66, p. 556-560, 2000.

CHRISTOPH, F.; STAHL-BISKUP, E.; KAULFERS, P.M. Death Kinetics of *Staphylococcus aureus* exposed to commercial tea tree oils s.l. **Journal of Essential Oils Research**, v. 13, p. 98-102, 2001.

CITADIN, I.; VICARI, I.J.; SILVA, T.T. et al. Qualidade de frutos de jaboticabeira (*Myrciaria cauliflora*) sob influência de duas condições de cultivo: sombreamento natural e pleno sol. **Revista Brasileira de Agrociências**, v. 11, n. 3, p. 373-375, 2005.

CLARO, F.B.; RIJSBRACK, K.; SOARES, E.V. Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: effect of ethanol, heat and osmotic stress. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 3, p. 693-700, 2007.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for Antifungal disk Diffusion Susceptibility Testing for Yeasts. Approved Guideline. CLSI document M44-A2. Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2009.

COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; SALOMAO, R. et al. High rate of non-*albicans* in Brazilian tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 34, p. 281-286, 1999.

COWAN, M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

COWEN, L.E. The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 187-198, 2008.

CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. Columbia: New York, 1981.

CRUZ, A.V.M.; KAPLAN, M.A.C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**, v. 11, n. 1, p. 47-52, 2004.

DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, A.P. et al. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. **Phytomedicine**, v. 10, n. 6-7, p. 511-516, 2003.

DAN, M.; POCH, F.; LEVIN, D. High rate of vaginal infections caused by non-*C. albicans* species among asymptomatic women. **Medical Mycology**, v. 40, n. 4, p. 383-386, 2002.

DAVID, R.; CARDE, J.P. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Academie des Sciences Paris**. Série D 258, p. 1338-1340, 1964.

DE NOBEL, J.G.; KLIS, F.M.; PRIEM, J. et al. The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 6, n. 6, p. 491-499, 1990.

DONADIO, L.C. Cuidados com a Jaboticabeira. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 23 nov. 1983. Suplemento Agrícola, p.16.

DONADIO, L.C. **Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg)**. Jaboticabal: Funep, 2000.

DONADIO, L.C.; MÔRO, F.V.; SERVIDONE, A.A. **Frutas Brasileiras**. Jaboticabal: Funep, 2002.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A. et al. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-311, 2005.

EINBOND, L.S.; REYNERTSON, K.A.; LUO X.D. et al. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, v. 84, p. 23-28, 2004.

ELLIS, M.; HEDSTROM, U.; JUMAA, A. et al. Epidemiology, presentation, management and outcome of candidemia in a tertiary care teaching hospital in the United Arab Emirates, 1995-2001. **Medical Mycology**, v. 41, p. 521-528, 2003.

ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, p. 711-713, 1998.

ESCALANTE, A.; GATTUSO, M.; PÉREZ, P. et al. Evidence for the Mechanism of Action of the Antifungal Phytolaccoside B Isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1720-1725, 2008.

ESPINEL-INGROFF, A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: Yeasts and filamentous fungi. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 25, p. 101-106, 2008.

ESPINEL-INGROFF, A. Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: a review of the literature (2005-2009). **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 1, p. 15-22, 2009.

FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, 2004. p. 229-245.

FARAG, R.S.; SHALABY, A.S.; EL-BAROTY, G.A. et al. Chemical and Biological Evaluation of the Essential Oils of Different *Melaleuca* Species. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 30-35, 2004.

FERRAZZA, M.H.S.H.; MALUF, M.L.F.; CONSOLARO, M.E.L. et al. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 2, p. 58-63, 2005.

FINLAY-JONES, J.; HART, P.; RILEY, T. *et al.* **Anti-inflammatory activity of tea tree oil**. Nedlands, Australia: Rural Industries Research and Development Corporation, 2001.

FLETCHER, J.P.; CASSELLA, J.P.; HUGHES, D.; CASSELLA, S. An evaluation of the mutagenic potential of commercially available tea tree oil in the United Kingdom. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 15, p. 81-86, 2005.

FLEURI, L.F.; SATO, H.H. **Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas**. Química Nova, v. 28, n. 5, p. 871-879, 2005.

FOLIN, O.; CIOCALTEAU, V. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 73, p. 424-427, 1927.

FORD, R.A. Fragrance raw materials monographs (tea tree oil). **Food and Chemical Toxicology**, v. 26, p. 407, 1988.

FRUITS lovers nursery. Disponível em:  
<http://www.fruitlovers.com/Jaboticaba2.jpg>. Acesso em: 14 de jan. de 2008.

GALLE, L.C.; GIANINNI, M.J.S.M. Prevalência e susceptibilidade de leveduras vaginais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 4, p. 229-236, 2004.

GALLO, M.B.C.; SILVA, F.C.; VIEIRA, P.C. et al. New natural products from *Siphoneugena densiflora* Berg (Myrtaceae) and their chemotaxonomic significance. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 279-288, 2006.

GANTER, P. ; JOLLÉS, G. **Histochimie normale et pathologique**. Paris, Villars: Gauthier, v. 2. 1969-1970.

GEISSMAN, T.A.; GRIFFIN, T.S. Sesquiterpenes lactones: acid-catalyzed color reactions as an aid structure determination. **Phytochemistry**, v. 10, p. 2475-2485, 1971.

GERTSCH, J.; TOBLER, R.T.; BRUN, R. et al. Antifungal, Antiprotozoal, Cytotoxic and Piscicidal Properties of Justicidin B and a New Arylnaphthalide Lignan from *Phyllanthus piscatorum*. **Planta Medica**, v. 69, n. 5, p. 420-424, 2003.



GERTSCH, J.; NIOMAWËB; GERTSCH-ROOST, K. et al. *Phyllanthus piscatorum*, ethnopharmacological studies on a women's medicinal plant of the Yanomami Amerindians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, n. 2-3, p. 181-188, 2004.

GHANNOUM, M.A.; RICE, L.B. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 501-517, 1999.

GILLUM, A.M.; TSAY, E.Y.H.; KIRSCH, D.R. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. **Molecular and General Genetics**, v. 198, n. 1, p. 179-182, 1984.

GROOT, P.W.J.; BOER, A.D.; CUNNINGHAM, J. et al. Proteomic Analysis of *Candida albicans* Cell Walls Reveals Covalently Bound Carbohydrate-Active Enzymes and Adhesins. **Eukaryotic Cell**, v. 3, n. 4, p. 955-965, 2004.

GROPPO, F.C.; RAMACCIATO, J.C.; SIMÕES, R.P. et al. Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms. **International Dental Journal**, v. 52, p. 433-437, 2002.

GUTIÉRREZ, R.M.P.; MITCHELL, S.; SOLIS R.V. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, p. 1-27, 2008.

HALCÓN L.; MILKUS, K. *Staphylococcus aureus* and wounds: A review of tea tree oil as a promising antimicrobial. **American Journal of Infection Control**, v. 32, n. 7, 2004.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Susceptibility of transient and commensal skin flora to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **American Journal of Infection Control**, v. 24, p. 186-189, 1996.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. In vitro susceptibility of *Malassezia furfur* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 35, p. 375-377, 1997.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. In-vitro activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida* spp. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, p. 591-595, 1998.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits germ tube formation by *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 38, p. 355-362, 2000.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 1081-1085, 2004.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. et al. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 616-625, 2006.

HARBORNE, J.B. **The Flavonoids**: advances in research since 1986. London: Chapman and Hall, 1996.

HARDMAN, R.; SOFOWORA, E.A. Antimony trichloride as test reagents for steroids, specially diosgenin and yamogenin, in plant tissues. **Stain Technology**, v. 47, p. 205-208, 1972.

HART, P.H.; BRAND, C.; CARSON, C.F. et al. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. **Inflammation Research**, v. 49, p. 619-26, 2000.

HAUSEN, B.M.; REICHLING, J.; HARKENTHAL, M. Degradation products of monoterpenes are the sensitizing agents in tea tree oil. **American Journal of Contact Dermatitis**, v. 10, p. 68-77, 1999.

HAWSER, S.; FRANCOLINI, M.; ISLAM, K. The effects of antifungal agents on the morphogenetic transformation by *Candida albicans* *in vitro*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 38, p. 579-587, 1996.

HAWSER, S.; ISLAM, K. Comparisons of the effects of fungicidal and fungistatic antifungal agents on the morphogenetic transformation of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, p. 411-413, 1999.

HAYES, A.J.; LEACH, D.N.; MARKHAM, J.L. In vitro cytotoxicity of Australian tea tree oil using human cell lines. **Journal of Essential Oil Research**, v. 9, p. 575-582, 1997.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A.K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v. 15, p. 639-652, 2008.

HERNÁNDEZ, N.E.; TERESCHUK, M.L.; ABDALA, L.R. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafí del Valle (Tucumán, Argentina). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 1-2, p. 317-322, 2000.

HINOUE, J.B.; HARVALA, C.E.; HINOUE, E.B. Antimicrobial activity screening of 32 common constituents of essential oils. **Pharmazie**, v. 44, p. 302-303, 1989.

HOLANDA, A.A.R.; FERNANDES, A.C.S.; BEZERRA, C.M. et al. Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 1, p. 3-9, 2007.

INTERNATIONAL Standard ISO 4730 Oil of *Melaleuca*, terpinen-1-ol type (Tea tree oil). Geneva: International Organisation for Standardisation, 1996.

ISHIDA, K.; MELLO, J.C.P.; CORTEZ, D.A.G. et al. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p. 942-949, 2006.

ISHIKAWA, T.; KATO, E.T.M.; YOSHIDA, M. et al. Morphoanatomic aspects and phytochemical screening of *Plinia edulis* (Vell.) Sobral (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 515-520, 2008.

ITO, A. CHAI, H.B.; LEE, D. et al. Ellagic acid derivatives and cytotoxic cucurbitacins from *Elaeocarpus mastersii*. **Phytochemistry**, v. 61, p. 171-174, 2002.

JABOTICABA ou Jabuticaba. Disponível em: <http://herbario.com.br/dataherb16/jaboticaba.htm>. Acesso em: 15 de março de 2007.

JACKSON, S.T.; MULLINGS, A.M.; RAINFORD, L. et al. The epidemiology of mycotic vulvovaginitis and the use of antifungal agents in suspected mycotic vulvovaginitis and its implications for clinical practice. **West Indian Medical Journal**, v. 54, n. 3, p. 192-195, 2005.

JANDOUREK, A.; VAISHAMPAYAN, J.K.; VAZQUEZ, J.A. Efficacy of *Melaleuca* oral solution for the treatment of fluconazole refractory oral candidiasis in AIDS patients. **AIDS**, v. 12, p. 1033-1037, 1998.

- JOHANSEN, D.A. **Plant Microtechnique**. New York: McGraw-Hill. 1940.
- KAPTEYN, J.C.; HOYER, L.L.; HECHT, J.E. et al. The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. **Molecular Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 601-611, 2000.
- KITAMURA, A.; HIGUCHI, S.; HATA, M. et al. Effect of  $\beta$ -1,6- Glucan Inhibitors on the Invasion Process of *Candida albicans*: Potential Mechanism of Their In Vivo Efficacy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 3963-3971, 2009.
- KLEPSER, M.E.; ERNST, E.J.; LEWIS, R.E. et al. Influence of Test Conditions on Antifungal Time-Kill Curve Results: Proposal for Standardized Methods. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 42, n. 5, p. 1207-1212, 1998.
- KLIS, F.M.; DE GROOT, P.; HELLINGWERF, K. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 39, p. 1-8, 2001.
- KNOBLOCH, K.; WEIS, N.; WEIGARD, H. Mechanism of antimicrobial activity of essential oils. **Planta Medica**, v. 52, p. 556-560, 1986.
- KOH, K.J.; PEARCE, A.L.; MARSHMAN, G. et al. Tea tree oil reduces histamine-induced skin inflammation. **The British Journal of Dermatology**, v. 147, p. 1212-1217, 2002.
- KOŁODZIEJ, H.; KAYSER, O.; LATTÉ, K.P. et al. Evaluation of the antimicrobial of tannins and related compounds using the microdilution broth method. **Planta Medica**, v. 65, p. 444-446, 1999.
- KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: Edur. 1997.

KUETE, V.; WABO, G.F.; NGAMENI, B. et al. Antimicrobial activity of the methanolic extract, fractions and compounds from the stem bark of *Irvingia gabonensis* (Ixonanthaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 54-60, 2007.

KUMAR, R.S.; GANVIR, S.M., HAZAREY, V.K. *Candida* and calcofluor White: study in precancer and câncer. **Journal of Oral and Maxillo Facial Pathology**, v. 13, n. 1, p. 2-8, 2009.

KURTZ, B.C.; ARAÚJO, D.S.D. Composição florística e estrutura do componente arbóreo de um trecho de Mata Atlântica na Estação Ecológica Estadual do Paraíso, Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 51, n. 78-115, p. 69-112, 2000.

LANDRUM, L.R.; KAWASAKI, M.L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v. 49, n. 4, p. 508-536, 1997.

LEE, K.L.; BUCKLEY, H.R.; CAMPBELL, C.C. An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycellal and yeast forms of *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 13, n. 2, p. 148-153, 1975.

LEE, S.H.; LEE, J.R.; LUNDE, C.S. et al. *In vitro* antifungal susceptibilities of *Candida albicans* and other fungal pathogens to polygodial, a sesquiterpene dialdehyde. **Planta Medica**, v. 65, p. 204-208, 1999.

LIMA, H.C.; GUEDES-BRUNI, R.R. Diversidade de plantas vasculares na reserva ecológica de Macaé de Cima. In: LIMA, H.C.; GUEDES-BRUNI, R.R. (eds.) **Serra de Macaé de Cima: Diversidade florística e conservação em Mata Atlântica**. 1 ed. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 1997. p. 28-39.

LIMA, I.O.; OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

LIU, M.; SEIDEL, V.; KATERERE, D.R. et al. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 325-329, 2007.

LOMBARDI, J.A.; GONÇALVES, M. Composição florística de remanescentes de Mata Atlântica do Sudeste de Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 23, n. 3, p. 255-282, 2000.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 3 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, v.1, 2000.

MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. **The Systematic Identification of Flavonoids**. New York: Springer-Verlag, 1970.

MAGALHÃES, M.M.; BARROS, R.S.; FINGER, F.F. Changes in nonstructural carbohydrates in developing fruit of *Myrciaria jaboticaba*. **Scientia Horticulturae**, v. 16, p. 209-215, 1996.

MARCHETTI, O.; BILLE, J.; FLUCKIGER, U. et al. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 311-320, 2004.

MARTENS, M.G.; HOFFMAN, P.; EL-ZAATARI, M. Fungal species changes in the female genital tract. **Journal of Low Genital Tract Diseases**, v. 8, n. 1, p. 21-24, 2004.

MATTOS, J.L.R. **Frutos indígenas comestíveis do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura, 1978.

MATTOS, J.L.R. **Frutíferas nativas do Brasil**. São Paulo: Nobel, 1983.

MAY, J.; CHAN, C.H.; KING, A. et al. Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, p. 639-43, 2000.

MCCULLOUGH, M.J.; ROSS, B.C.; READE, P.C. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. **International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 25, p. 136-144, 1996.

MEDRANO, D.J.A.; BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A. et al. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 1, p. 17-20, 2006.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. Oxford: Clarendon Press, 1950. v. 1. p. 620-631.

MELALEUCA. **Wikipedia, the free encyclopedia**. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Melaleuca>. Acesso em: 14 de jan. de 2008.

*Melaleuca alternifolia* (Cheel.). Disponível em: [http://www.anbg.gov.au/images/photo\\_cd/632030813539/043\\_2.jpg](http://www.anbg.gov.au/images/photo_cd/632030813539/043_2.jpg). Acesso em: 14 de jan. de 2008a.

*Melaleuca alternifolia* (Cheel.). Disponível em: [http://www.anbg.gov.au/images/photo\\_cd/S1710C6200671/005\\_2.jpg](http://www.anbg.gov.au/images/photo_cd/S1710C6200671/005_2.jpg). Acesso em: 14 de jan. de 2008b.



- MELALEUCA ALTERNIFOLIA - (Maiden.&Betche.) Cheel. **Plants For A Future**, 2004. Disponível em: <http://www.pfaf.org/database/plants.php?Melaleuca+alternifolia>. Acesso em 14 de jan. de 2008.
- MILLER, C. Pouring a healing oil over troubled waters. **Australian Doctor**, v. 7, p. 14-15, 1984.
- MONDELLO, F.; BERNARDIS, F.; GIROLAMO, A. et al. *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic yeasts. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 1223-1229, 2003.
- MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; LINS NETO, E.M.F. et al. The effects of seasonal climate changes in the Caatinga on tannin levels in *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. and *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 338-344, 2006.
- MORA-MONTES, H.M.; BATES, S.; NETEA, M.G. et al. Endoplasmic Reticulum  $\alpha$ -Glycosidases of *Candida albicans* Are Required for N Glycosylation, Cell Wall Integrity, and Normal Host-Fungus Interaction. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 12, p. 2184-2193, 2007.
- MORAN, G.P.; SULLIVAN, D.J.; COLEMAN, D.C. Emergence of non-*Candida albicans* *Candida* Species as Pathogens. In: CALDERONE, R.A. **Candida and Candidiasis**. New York: ASM Press, 2002. p. 37-53.
- MOTHANA, R.A.A.; LINDEQUIST, U. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 177-181, 2005.
- MUNRO, C.A., SCHOFIELD, D.A., GOODAY, G.W. et al. Regulation of chitin synthesis during dimorphic growth of *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 144, p. 391-401, 1998.

NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição. Norma M27-A2 do NCCLS. Wayne, Pennsylvania: NCCLS, 2002.

NELSON, R.R.S. In-vitro activities of five plant essential oils against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 40, p. 305-306, 1997.

NETEA, M.G.; GOW, N.A.R.; MUNRO, C.A. et al. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 6, p. 1642-1650, 2006.

NETEA, M.G.; BROWN, G.D.; KULLBERG, B.J. et al. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. **Nature Reviews/Microbiology**, v. 6, p. 67-78, 2008.

NGUYEN, M.H.; PEACOCK Jr., J.E.; MORRIS, A.J. et al. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. **American Journal of Medicine**, v. 100, p. 617-623, 1996.

NOLLIN, S.; BORGERS, M. Scanning Electron Microscopy of *Candida albicans* After In Vitro Treatment with Miconazole. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 7, n. 5, p. 704-711, 1975.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 5421-5426, 2000.

OCHSE, J.J.; SOULE JR, M.J.; DIJKMAN, M.J. et al. **Tropical and subtropical agriculture**. 2. ed. New York: The Macmillan Company, 1966. p. 684-686.

ODDS, F.C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, 2003. doi:10.1093/jac/dkg301.

ODDS, F.V.; BROWN A.J.P.; GOW, N.A.R. Antifungal agents: mechanisms of action. **TRENDS in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272-279, 2003.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; ASHIDA, M. et al. Tannins of *Casuarina* and *Stachyurus* species. Part 1. Structure of pendunculagin, casuarictin, strictinin, casuarinin, casuariin and stachyurin. **Journal of the Chemical Society**. Perkin Transactions 1, p. 1765-1772, 1983.

OHNO, Y.; MIYAJIMA, A.; SUNOUCHI, M. Alternative methods for mechanistic studies in toxicology. Screening of hepatotoxicity of pesticides using freshly isolated and primary cultured hepatocytes and non-liver-derived cells, SIRC cells. **Toxicology Letters**, v. 102-103, p. 569-573, 1998.

OLIVA, B.; PICCIRILLI, E.; CEDDIA, T. et al. Antimycotic activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its major components. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 185-187, 2003.

ONYEWU, C.; BLANKENSHIP, J.R.; POETA, M. et al. Ergosterol Biosynthesis Inhibitors Become Fungicidal when Combined with Calcineurin Inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n.3, p. 956-964, 2003.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

OSUMI, M. The Ultrastructure of Yeast: Cell Wall Structure and Formation. **Micron**, v. 29, n. 2-3, p. 207-233, 1998.

OZCAN, S.K.; BUDAK, F.; YUCESYOY, G. et al. Prevalence, susceptibility profile and proteinase production of yeasts causing vulvovaginitis in Turkish women. **APMIS**, v. 114, n. 2, p. 139-145, 2006.

PACKER, J.F.; LUZ, M.M.S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 102-107, 2007.

PALIWAL, S.; SUNDARAM, J.; MITRAGOTRI, S. Induction of cancer-specific cytotoxicity towards human prostate and skin cells using quercetin and ultrasound. **British Journal of Cancer**, p. 1-4, 2005.

PATTERSON, T.F. Advances and challenges in management of invasive mycoses. **The Lancet**, v. 366, n. 9490, p. 1013-1025, 2005.

PEÑA, E.F. *Melaleuca alternifolia* oil. Its use for *Trichomonal vaginitis* and other vaginal infections. **Obstetrics and gynecology**, v. 19, p. 793-795, 1962.

PEREIRA, M.; OLIVEIRA, A.L.; PEREIRA, R.E.A. et al. Morphologic and molecular characterization of *Myrciaria* spp species. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 3, p. 507-510, 2005.

PHARMACOPEIA dos Estados Unidos do Brasil. 1 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1926.

QUETTIER-DELEU, C.; GRESSIER, B.; VASSEUR, J. et al. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat hulls and flour. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 35-42, 2000.

REES, J.R.; PINNER, R.W.; HAJJEH, R.A. et al. The epidemiological features of invasive mycotic infections in the San Francisco Bay area, 1992-1993: results of population-based laboratory active surveillance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, p. 1138-1147, 1998.

REICHLING, J. Tea Tree – The Genus *Melaleuca*: Book Reviews. **Phytochemistry**, v. 58, p. 533-535, 2001.

REYNERTSON, K.A.; WALLACE, A.M.; ADACHI, S. et al. Bioactive Depsides and Anthocyanins from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1228-1230, 2006.

RIVERO, M.; CENTENO, S.; DÍAZ, J. Frecuencia de especies de candida aisladas en pacientes embarazadas con vulvovaginitis. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 23, n. 2, p. 148-152, 2003.

ROMAGNOLO, M.B.; SOUZA, M.C. Os gêneros *Calycorectes* O. Berg, *Hexachlamys* O. Berg., *Myrciaria* O. Berg. e *Plinia* L. (Myrtaceae) na planície alagável do alto rio Paraná, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v. 18, n. 3, p. 613-627, 2004.

RUIZ-HERRERA, J.; ELORZA, M.V.; VALENTÍN, E. et al. Molecular organization of the cellwall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. **FEMS Yeast Research**, v. 6, p. 14-29, 2006.

RUSSEL, M.; SOUTHWELL, I. Monoterpenoid accumulation in *Melaleuca alternifolia* seedlings. **Phytochemistry**, v. 59, p. 709-716, 2002.

SAFDAR, A.; PERLIN, D.S.; ARMSTRONG, D. Hematogeneous infections due to *C. parapsilosis*: changing trends in fungemic patients at a comprehensive cancer center during the last four decades. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 44, p. 11-16, 2002.

SALLER, R.; BERGER, T.; REICHLING, J. et al. Pharmaceutical and medicinal aspects of Australian tea tree oil. **Phytomedicine**, v. 5, p. 489-495, 1998.

SALMINEN, J.P.; OSSIPOV, V.; LOPONEN, J. et al. Characterization of hydrolysable tannins from leaves of *Betula pubescens* by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 864, p. 283-291, 1999.

SANGETHA, S.; ZURAINI, Z.; SURYANI, S. et al. In situ TEM and SEM studies on the antimicrobial activity and prevention of *Candida albicans* biofilm by *Cassia spectabilis* extract. **Micron**, v. 40, n. 4, p. 439-443, 2009.

SATCHELL, A.C.; SAURAJEN, A.; BELL, C. et al. Treatment of interdigital tinea pedis with 25% and 50% tea tree oil solution: a randomized, placebo-controlled, blinded study. **The Australasian Journal of Dermatology**, v. 45, p. 175-178, 2002.

SAUTOUR, M.; MITAINE-OFFER, A.C.; MIYAMOTO, T. et al. Antifungal steroid saponins from *Dioscorea cayenensis*. **Planta Medica**, v. 70, p. 90-92, 2004.

SELVAAG, E.; ERIKSEN, B.; THUNE, P. Contact allergy to tea tree oil and cross-sensitization to colophony. **Contact Dermatitis**, v. 31, p. 124-125, 1994.

SELVAAG, E.; HOLM, J.O.; THUNE, P. Allergic contact dermatitis in an aroma therapist with multiple sensitizations to essential oils. **Contact Dermatitis**, v. 33, p. 354-345, 1995.

SERAFIN, C.; NART, V.; MALHEIROS, A. et al. Avaliação do potencial antimicrobiano de *Plinia glomerata* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 578-582, 2007.

SEVERI, J.A.; FERTIG, O.; PLITZKO, I et al. Oleanane Saponins and Glycerogalactolipids from the Leaves of *Guapira graciliflora*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 93, p. 1058-1066, 2010.

SHELLIE, R.; MARRIOTT, P.; CORNWELL, C. Characterization and Comparison of Tea Tree and Lavender Oils by Using Comprehensive Gas Chromatography. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 23, n. 9, p. 554-560, 2000.

SHER, A. Antimicrobial activity of natural products from medicinal plants. **Gomal Journal of Medical Sciences**, v.7, n.1, p. 72-78, 2009.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v. 59, p. 201-222, 1995.

SILVA, M.A.; SUMITAMI, J.S.A.; VILEGAS, W. et al. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de *Leiothrix flavescens* (Bong.) Ruhland (Eriocaulaceae). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 28, n. 3, p. 319-324, 2007.

SNYDER, R.D.; GREEN, J.W. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. **Mutation Research**, v. 488, n. 2, p. 151-169, 2001.

SOBEL, J.D.; ZERVOS, M.; REED, B.D. et al. Fluconazole susceptibility of vaginal isolates obtained from women with complicated *Candida* vaginitis: clinical implications. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 34-38, 2003.

SOBRAL, M. Alterações nomeclaturais em *Plinia* (Myrtaceae). **Boletim do Museu Botânico de Curitiba**, n. 63, p. 1-4, 1985.

SÓCZÓ, G.; KARDOS, G.; MCNICHOLAS, P.M. et al. Correlation of posaconazole minimum fungicidal concentration and time-kill test against nine *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 1004-1009, 2007.

SOJAKOVA, M.; LIPTAJOVA, D.; BOROVSKEY, M. Fluconazole and itraconazole susceptibility of vaginal yeast isolates from Slovakia. **Mycopathologia**, v. 157, p. 163-169, 2004.

SOUTHWELL, I.; MARKHAM, J.; MANN, C. **Significance of cineole for bioactivity and irritancy in tea tree oil**. Nedlands, Australia: Rural Industries Research and Development Corporation, 1997.

SOUTHWELL, I.; LEACH, D.; LOWE, R.; POLLACK, A. Quality assurance for tea tree oil safety investigative samples. Australian Government. Rural Industries Research and Development Corporation. 2006.

SOUZA, E.L.; STAMFORD, T.L.M.; LIMA, E.O. et al. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18, p. 409-413, 2007.

SOUZA, T.M.; MOREIRA, R.R.D.; SACRAMENTO, L.V.S. et al. Histochemical, phytochemical and biological screening of *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel, Myrtaceae, leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 48-53, 2010.

STASI, L.C.; GUIMARÃES, E.M.; SANTOS, C.M. et al. Fabales medicinais. In: STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2 ed. São Paulo: Editora UNESP, 2002. p. 276-320.

STEVENS, D.A.; ICHINOMIYA, M.; KOSHI, Y. et al. Escape of *Candida* from Caspofungin Inhibition at Concentrations above the MIC (Paradoxical Effect)



Accomplished by Increased Cell Wall Chitin; Evidence for  $\beta$ -1,6-Glucan Synthesis Inhibition by Caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 9, p. 3160-3161, 2006.

SUDBERY, P.; GOW, N.; BERMAN, J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v. 12, p. 317-324, 2004.

SYED, T.A.; QURESHI, Z.A.; ALI, S.M. et al. Treatment of toenail onychomycosis with 2% butenafine and 5% *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in cream. **Tropical Medicine & International Health**, v. 4, p. 284-287, 1999.

TAKAHASHI, Y.; KOIKE, M.; HONDA, H. et al. Development of the short time exposure (STE) test: An in vitro eye irritation test using SIRC cells. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 760-770, 2008.

TEEBAUMÖL. Disponível em: <http://www.omikron-online.de/naturhaus/angebote/aethoel/monograf/teeb.htm>. Acesso em: 30 de ago. de 2010.

TEMPONE, A.G.; SARTORELLI, P.; TEIXEIRA, D. et al. Brazilian flora extracts as source of novel antileishmanial and antifungal compounds. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 443-449, 2008.

TOKUNAGA, M.; KUSAMICHI, M.; KOIKE, H. Ultrastructure of Outermost Layer of Cell Wall in *Candida albicans*. **Journal of Electron Microscopy**, v. 35, n. 3, p. 237-246, 1986.

TONG, M.M.; ALTMAN, P.M.; BARNETSON, R.S. Tea tree oil in the treatment of tinea pedis. **The Australasian Journal of Dermatology**, v. 33, p. 145-149, 1992.

TSUI, C.K.M.; DANIEL, H.M.; ROBERT, V. et al. Re-examining the phylogeny of clinically relevant *Candida* species and allied genera based on multigene analyses. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 651-659, 2008.

VALETTE, C.; ANDARY, C.; GEIGER, J.P. et al. Histochemical and cytochemical investigations of phenols in roots of banana infected by the burrowing nematode *Radopholus similis*. **Phytopathology**, v. 88, p. 1141-1148, 1998.

VAZQUEZ, J.A.; ARGANOZA, M.T.; BOIKOV, D. In vitro susceptibilities of *Candida* and *Aspergillus* species to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 17, p. 60-63, 2000.

VERZA, S.G.; KREINECKER, M.T.; REIS, V. et al. Avaliação das variáveis analíticas do método de folin-ciocalteu para determinação do teor de taninos totais utilizando como modelo o extrato aquoso de folhas de *Psidium guajava* L. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 815-820, 2007.

VICENTE, M.F.; PELAÉZ, F. Situación actual de la terapia antifúngica. In: ZACCHINO, S.; GUPTA, M. **Manual de técnicas *in vitro* para la detección de compuestos antifúngicos**. Rosario: Corpus Editorial y Distribuidora, 2007. p. 5-14.

VIEIRA, T.R.; BARBOSA, L.C.A.; MALTHA, C.R.A. et al. Constituintes químicos de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 536-539, 2004.

VILLAN, D.; KNIGHT, M.J.; HANSEN, S.R. et al. Toxicity of *Melaleuca* oil and related essential oils applied topically on dogs and cats. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 36, p. 139-142, 1994.

WAGNER, H., BLADT, S., ZGAINSKI, E.M. **Plant Drug Analysis**. Berlin: Springer-Verlag, 1984.

WALKER, M. Clinical investigation of Australian *Melaleuca alternifolia* oil for a variety of common foot problems. **Current Pediatrics**, v. 43, p. 28-34, 1972.

WALKER, L.A.; MUNRO, C.A.; BRUIJN, I. et al. Stimulation of Chitin Synthesis Rescues *Candida albicans* from Echinocandins. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 4, p. 1-12, 2008.

WHITE, D.G.; GOLDMAN, J.D.; DEMPLE, B. et al. Role of the *acrAB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS*, or *robA* in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 6122-6126, 1997.

YOSHIDA, T.; HATANO, T.; ITO, H. et al. Chemical and Biological perspectives of ellagitannin oligomers from medicinal plants. In: ATTA-UR-RAHMAN. **Studies in Natural Products Chemistry: Bioactive Natural Products (Part D)**. v. 23. Holanda: Elsevier, 2000. p. 395-453.

ZAKIKHANY, K.; NAGLIK, J.R.; SCHMIDT-WESTHAUSEN, A. et al. *In vivo* transcript profiling of *Candida albicans* identifies a gene essential for interepithelial dissemination. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 12, p. 2938-2954, 2007.

ZHANG, J.D.; XU, Z.; CAO, Y.B. et al. Antifungal activities and action mechanisms of compounds from *Tribulus terrestris* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 76-84, 2006.

## ANEXO A

Tabela I: Deslocamentos químicos de RMN de casuarinina (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)

Posição	$\delta^1\text{H}$ (J Hz)	$\delta^{13}\text{C}^*$	COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ )	HMBC
1	5,38 (dd, $J = 4,0; 8,8$ ), 1H	65,6	4,56	116,0, 75,3; 68,4
2	4,56 (m), 1H	75,3	5,38; 5,17	164,4, 65,6
3	5,17 (dd, $J = 2,4; 4,8$ ), 1H	68,4	4,56	169,1; 75,3, 68,4; 65,6
4	5,26 (dd, $J = 2,8; 8,8$ ), 1H	72,9		167,8, 69,5
5	5,22 (dd, $J = 2,0; 8,8$ ), 1H	69,5	4,53	72,9; 63,7
6	4,00 dd (dd, $J = 13,0; 2,0$ ), 1H	63,7	4,53	72,9; 69,5
	4,53 (m), 1H		5,22; 4,00	168,4; 72,9
<b>Galoil</b>				
1		118,7		
2/6	6,94 (s), 2H	108,7		108,7; 118,7; 139,0; 145,8; 164,4
3/5		145,8		
4		139,0		
C=O		164,4		
<b>HHDP</b>				
1				
2		114,4		
3				
4		134,6		
5		144,7		
6	6,29 (s), 1H	104,6		114; 134; 144; 168
C=O		168,4		
1'				
2'		116,0		
3'				
4'		136,2		
5'		144,7		
6'	6,57 (s), 1H	106,1		116,0; 136,2; 144,7; 167,8
C=O		167,8		
<b>HHDP</b>				
1''				
2''		115,4		
3''				
4''		133,9		
5''		144,7		
6''	6,25 (s), 1H	103,1		115,4; 133,9; 144,7; 169,1
C=O		169,1		
1'''				
2'''				
3'''				
4'''				
5'''				
6'''		116,0		
C=O		164,4		

\* Valores de  $^{13}\text{C}$  obtidos pelas projeções dos experimentos HSQC e HMBC

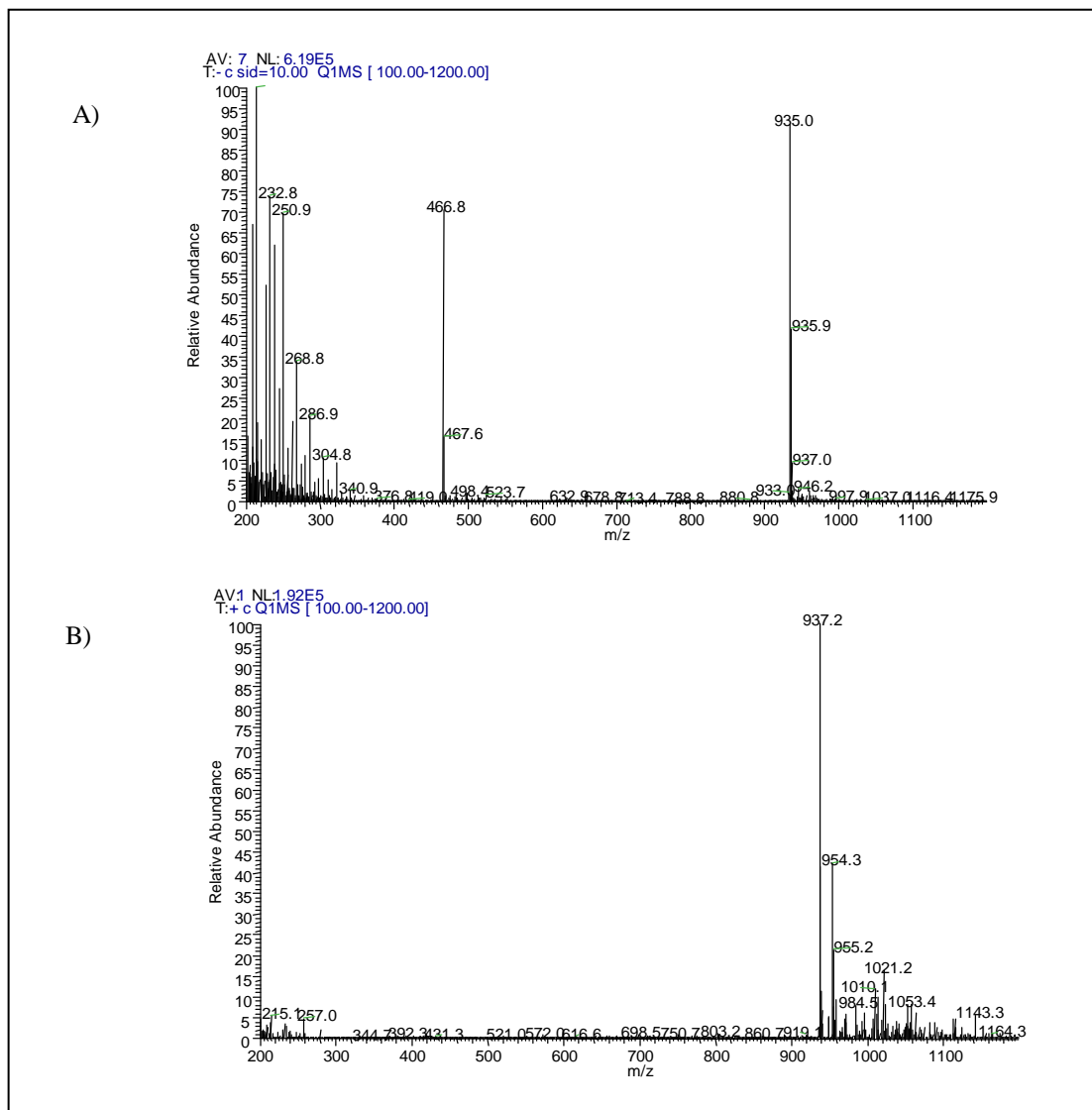


Figura I: Espectros de massas de casuarinina. A) Modo negativo. B) Modo positivo.